

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA

HOSPITAL "12 DE OCTUBRE"

PERFIL CITOGÉNÉTICO DE LA ENFERMEDAD PARATIROIDEA

Autor: D. Ramiro Gálvez Valdovinos

Director: Prof. D. Felipe de la Cruz Vigo

Tesis realizada para aspirar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Madrid, Enero 1996

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

D. RAMIRO GALVEZ VALDOVINOS ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado (**perfil citogenético de la enfermedad paratiroidea**), que estudia las alteraciones cromosómicas de los diferentes tipos de hiperparatiroidismo en pacientes intervenidos en el Hospital "12 de Octubre". de Madrid.

Dicho estudio reúne por el rigor científico y la metodología aplicada, las características requeridas para ser leído como Tesis Doctoral.

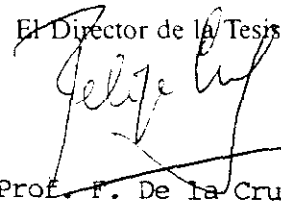
V.º B.º
EL TUTOR (2)

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.: _____

El Director de la Tesis



Prof. F. De la Cruz Vigo

Fdo.: _____
(fecha y firma) 16/ENERO/1996

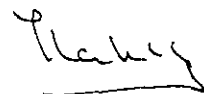
D.N.I.: 31.184.342-E

INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

La Tesis Doctoral titulada "Perfil citogenético de la enfermedad paratiroidea", realizada por D. Ramiro Gálvez -- Valdovinos , bajo la dirección del Prof. F. de la Cruz Vigo, ha sido considerada por el Consejo del Departamento apta para ser presentada ante el Tribunal Calificador.

Fecha reunión
Consejo Departamento
20 Diciembre 1995

El Director del Departamento



Fdo.: Prof. J.L. Balibrea
(fecha y firma)

Llegué a España siendo un desconocido y, gracias a Dios, encontré manos amigas que me dieron la oportunidad de formarme en la profesión de Cirujano. A todos ellos agradezco el brindarme su amistad, su confianza y el haberme ayudado, guiado y enseñado, no solo en el arte de la Cirugía, sino también en todos los aspectos Humanos y éticos de la Medicina.

En primer lugar quiero dar mi más profundo agradecimiento a Prof. D. Felipe de la Cruz Caro, Jefe del Departamento de Cirugía del Hospital "12 de Octubre" y Jefe del Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo "A", al que he pertenecido, y Catedrático de Patología Quirúrgica de la Universidad Complutense de Madrid, por su confianza a mi persona y por ayudarme a iniciar la gran aventura de la profesión.

Al Dr. D. Felipe de la Cruz Vigo, Jefe de Sección del Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo "A" del Hospital "12 de Octubre" de Madrid y Profesor Titular de Patología Quirúrgica de la Universidad Complutense de Madrid, director de este trabajo. Le agradezco la acogida que me brindó cuando llegué, y como no, el apoyo, la amistad, la enseñanza y los consejos ofrecidos en mi formación y realización de esta Tesis.

Quiero mostrar especialmente mi agradecimiento a la Bióloga María Luisa Marqués Negredo, Becaria del Servicio de Genética del Hospital Universitario "12 de Octubre" que, de manera desinteresada, me ayudo en la realización de esta Tesis, cuya ejecución no hubiera sido posible sin su valiosa cooperación.

Quiero agradecer a todos los médicos adjuntos de la Sección la paciencia, orientación, amistad y enseñanza que me han ofrecido durante estos años.

A todos mis compañeros Residentes quiero expresarles mi agradecimiento por alentarme en los momentos difíciles de la formación y por todos esos buenos momentos vividos durante la misma.

Al D. Dr. Miguel Rodríguez Macias, Médico y miembro de la Organización de Naciones Unidas, Ex Director de la O.I.T, quiero manifestarle publicamente mi gratitud por el apoyo y la ayuda brindada.

A todos ellos mi más sincero agradecimiento.

A Cynthia

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1.– Historia.....	2
I.2.– Principios básicos de la genética.....	3
I.3.– División celular.....	4
I.4.– Ciclo celular.....	6
I.5.– Estructura y función de los cromosomas.....	9
I.6.– Partes del cromosoma humano.....	10
I.7.– Clasificación de los cromosomas.....	12
I.8.– Cariotipo humano.....	14
I.9.– Ordenación cromosómica.....	15
I.10.– Diferenciación cromosómica.....	16
I.11.– Nomenclatura.....	17
I.12.– Nomenclatura internacional en citogenética.....	20
I.13.– Alteraciones cromosómicas.....	23
I.14.– Mecanismos de producción de alteraciones cromosómicas.....	24
I.15.– Alteraciones cromosómicas estructurales.....	24
I.16.– Enfermedad genética.....	31
I.17.– Aspectos éticos.....	31
I.18.– Alteraciones cromosómicas en patologías malignas.....	32
I.19.– Importancia de los cambios cromosómicos en los tumores benignos.....	36
I.20.– Citogenética en el adenoma paratiroideo.....	40
I.21.– Anormalidades de otras glándulas endocrinas.....	43
I.22.– Fisiología celular y fisiopatología de las glándulas paratiroides.....	44

I.23.– Regulación de la liberación de la hormona paratiroidea por el calcio extracelular.....	46
I.24.– Regulación de la liberación de la PTH en el hiperparatiroidismo.....	48
I.25.– Proliferación de células paratiroideas.....	50
I.26.– Epidemiología del hiperparatiroidismo primario.....	52
I.27.– Diagnóstico del hiperparatiroidismo.....	54
I.28.– Presentación clínica y sintomatología.....	57
I.29.– Hiperparatiroidismo secundario.....	62
I.30.– Neoplasia endocrina multiple tipo.....	63

II. OBJETIVOS.....64

III. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO.....65

IV. MATERIA Y MÉTODOS.....66

IV.1.– Material.....	66
IV.1.1.– Componente para procesar las muestras.....	66
IV.2.– Método.....	73
IV.2.1.– Estudio de la sangre periférica.....	73
IV.2.2.– Método de bandeo.....	74
IV.2.3.– Técnicas de bandas.....	74
IV.2.4.– Estudio del tejido paratiroideo.....	75
IV.2.5.– Método de tinción.....	81
IV.3.– Análisis estadístico.....	83
IV.4.– Pacientes	83
IV.5.– Grupo control.....	113

V. RESULTADOS.....	114
V.1.– Resultados de los métodos de cultivo celular.....	114
V.2.– Resultados de otros cultivos celulares.....	118
V.3.– Resultados de los hallazgos citogéticos.....	119
V.4.– Resultados del grupo control.....	184
V.5.– Resultados del análisis estadístico.....	186
V.6.– Resultados citogenéticos en linfocitos.....	190
V.7.– Resultados citogenéticos del tejido.....	195
 VI. DISCUSIÓN.....	 199
VI.1.– Del grupo de pacientes.....	200
VI.2.– De la Intervención.....	203
VI.3.– Del cultivo de linfocitos.....	205
VI.4.– Del cultivo de tejido paratiroideo.....	206
VI.5.– De los mecanismos moleculares de la enfermedad paratiroidea.....	208
VI.6.– Del análisis citogenético de los linfocitos.....	210
VI.7.– Del análisis citogenético del tejido paratiroideo.....	219
 VII. RESUMEN.....	 225
 VIII. CONCLUSIONES.....	 230
 IX. BIBLIOGRAFÍA.....	 233

I. INTRODUCCIÓN

La variabilidad genética o polimorfismo en la población en general es la responsable de gran parte de las variaciones normales de los rasgos corporales de cada individuo, tales como la altura, la inteligencia, la tensión arterial, etc. Dichas diferencias genéticas también determinan la capacidad de cada individuo para enfrentarse a las agresiones y desafíos ambientales, incluidos los causantes de los procesos patológicos.

Todas las enfermedades del ser humano pueden considerarse como el resultado de la interacción entre la constitución genética única del individuo y el entorno. En algunas afecciones, el componente genético es tan poderoso, que se expresa de forma previsible sin necesidad de estímulos ambientales extraordinarios. Estos cuadros se denominan enfermedades genéticas.

I.1.- HISTORIA

Ha pasado más de un siglo desde la primera descripción detallada de la división celular en el humano. En 1878-1879, Schleicher¹ introduce el termino "cariotipo". Este nuevo concepto desencadena nuevos caminos hacia la investigación y con ello la aparición de nuevos términos tales como mitosis, cromatina [Flemming 1880²] y cromosoma [Waldeyer 1888³].

En 1879, Arnold⁴ y Flemming (1882²) fueron los primeros autores que examinaron cromosomas mitóticos humanos. Winiwater (1912⁵) estudió las células germinales en cortes histológicos; refiere en su comunicación: "la dificultad estriba en que los cromosomas aparecen apelotonados y no es posible individualizarlos". Estableció un número de cromosomas para los varones (47) y otro para las mujeres (48). Esta descripción conduce a que Painter⁶ en 1921 publicara en la revista "Science" que el humano tiene 48 cromosomas y que las letras XX caracterizan a las mujeres y las letras XY a los hombres. Fue en 1956 cuando Tjio y Levan⁷, sometiendo las células cultivadas a un choque hipotónico controlado, establecieron el número correcto de cromosomas de la especie humana. En el mismo año Ford y Hamerton⁸, estudiando el tejido testicular, observaron 23 pares de cromosomas, lo que confirmó los resultados de las investigaciones de Tjio y Levan.

I.2.- PRINCIPIOS BÁSICOS DE LA GENÉTICA

Los ácidos nucleicos fueron aislados por Miescher en 1870 y deben su nombre a su carácter ácido y al hecho de haberse encontrado por primera vez en el núcleo [Ayala 1984⁹]. Existen dos variedades de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (ADN), y el ácido ribonucleico (ARN). Ambos presentan una composición química similar y se diferencian por su localización dentro de la célula, por su estructura y función [Gelehrter 1990¹⁰].

Toda la información hereditaria se transmite de sus progenitores a sus descendientes a través del ADN. El ADN es un polímero lineal compuesto por bases púricas y pirimídicas cuya disposición determina, en último término, la secuencia de aminoácidos de todas las proteínas sintetizadas por el organismo [Thompsn 1990¹¹].

Los cuatro tipos de bases del ADN (adenina, guanidina, citosina y timina o uracilo) están ordenados en grupos de tres y cada uno de estos tripletes constituyen una palabra clave o codón que codifica a un aminoácido determinado [Vogel 1986¹²].

Dentro de los cromosomas se encuentran los genes; estos representan la secuencia de aminoácidos de una única cadena polipeptídica de una molécula proteica. El ADN de la mayor parte de los genes está fragmentado en regiones codificadoras discretas (exones) separadas entre sí por regiones no codificadoras (intrones o secuencias intercaladas). Las regiones codificadoras contienen las bases que especifican la secuencia de aminoácidos en la cadena polipeptídica, las secuencias intercaladas se componen de bases que actúan como espaciadores entre las regiones codificadoras y no se traducen en proteínas.

El contenido en ADN del núcleo de cada célula humana es suficiente para codificar más de 50.000 genes, y por consiguiente, para especificar todas las cadenas polipeptídicas.

Los genes se disponen en una secuencia lineal de ADN que, junto a ciertas proteínas (histonas) forman estructuras en forma de bastón denominadas cromosomas [Lewin 1990¹³].

Según Morgan¹⁴ el "locus" es el sitio que ocupa un gen en el cromosoma⁸.

Un "alelo" es la forma o alternativa de un gen en las regiones cromosómicas correspondientes de dos cromosomas pares. Un gen va a determinar un carácter, pero el fenotipo o expresión de dicho carácter va a depender de los alelos que muestra el gen para ese carácter. Si el alelo de un gen para un carácter es "dominante", entonces este carácter se mostrará en el fenotipo. Si, por el contrario, el alelo es recesivo, puede que ese carácter no esté presente en el fenotipo. Así pues, podemos hablar de individuos "homocigóticos" o "heterocigóticos" para un carácter. Serán homocigóticos cuando ese gen tiene los dos alelos iguales y heterocigóticos si esos dos alelos son diferentes [Makusick 1992¹⁵].

I.3.- DIVISIÓN CELULAR

Una célula es la unidad anatómica y fisiológica de los seres vivos; parte más pequeña del ser vivo que tiene vida propia [Schleicher 1879¹⁶]. Por tanto en una célula deben de existir todos los mecanismos para llevar a cabo las funciones vitales de los seres vivos: nutrición, crecimiento, relación, reproducción, etc .

El crecimiento de cualquier organismo se acompaña de un aumento de peso. El aumento de peso en los períodos de crecimiento se debe principalmente al incremento proporcionado de todos sus órganos y tejidos, incremento que se consigue mediante la división continuada de sus células. La división celular no es, sin embargo, exclusiva de los períodos de crecimiento del ser vivo, esta es continuada también a lo largo de toda la vida, para reponer las células que mueren espontáneamente o como consecuencia de cualquier tipo de lesión [Scriver 1994¹⁷].

Cada célula, al dividirse, origina dos células que son idénticas a la parental, por ello la progenie de una célula renal, hepática, etc. son siempre células del tipo correspondiente.

Una condición fundamental para la división de una célula eucarionte es la presencia de núcleo. La importancia del núcleo estriba en que en él se encuentra el ADN, que es el portador de la información genética que caracteriza a la célula de cada organismo.

Cada especie animal o vegetal, tiene un número definido de cromosomas diferentes, cada uno de los cuales es portador de una información genética definida.

A las células que contienen una sola copia de cada cromosoma, se les denomina haploides. La mayor parte de las células somáticas tienen en cambio, una doble representación de cada tipo de cromosoma, y se dice que son diploides.

A los dos cromosomas de un mismo tipo se les denomina homólogos. Los cromosomas homólogos, no tienen idéntica información genética, aunque sí son portadores de ADNs, que expresan los mismos caracteres [Weatherall¹⁸].

I.4.- CICLO CELULAR

Cuando las células se dividen, repiten el ciclo cuya duración depende del tipo de célula. En el ciclo celular se distinguen cuatro períodos o estadios G1 , S, G2, y MITOSIS ^{9,10}.

a). PERÍODO G1: (27 horas).-

Este período significa que la célula está en espera antes de iniciar la síntesis del ADN. Durante G1, la célula crece en tamaño, y en su interior tienen lugar gran parte de los procesos metabólicos. El ADN, que se encuentra desarrollado, corresponde al que más adelante se condensará y formará las cromátidas homólogas.

b). PERÍODO "S" (DE SÍNTESIS): (13 horas).-

Durante él, se verifica la síntesis de ADN presente en el período G1 [Howard 1974¹⁹]. Dicho de otra forma, se produce una copia idéntica de cada cromátide. Al final del período S habrá suficiente ADN para formar los futuros cromosomas de las dos células que se van a formar.

c). PERÍODO G2 : (3 horas).-

Segundo período de espera que antecede a la mitosis. Durante este período, la célula tiene un metabolismo parecido al del período G1, pero adicionalmente se sintetizan estructuras que están directamente relacionadas con el período siguiente, tales como las fibras del huso acromático. Es frecuente englobar a los períodos G1, S y G2 con el nombre de interfase.

d). MITOSIS : (1 hora).–

Durante este período, la célula se divide en dos células hijas con idéntica formación genética. Durante la mitosis, el ADN se condensa para distribuirse entre dos células hijas con arreglo a unos procesos muy complejos que suelen agruparse en cuatro fases: "profase, metafase, anafase y telofase".

e). PROFASE:

Inmediatamente antes de la profase el ADN se encuentra extendido por todo el núcleo; la membrana nuclear está intacta y en el citoplasma pueden apreciarse dos pares de orgánulos denominados centriolos (Boveri 1895²⁰). Durante la profase se verifican los siguientes fenómenos:

1º. La cromatina comienza a condensarse; cada fibra de ADN formará una cromátida. Los pares de cromátidas iguales, se unen entre sí por medio del centrómero y se estructuran los cromosomas. Al final de la profase, los cromosomas se encuentran distribuidos al azar dentro del espacio nuclear.

2º. Mientras ocurren los procesos anteriores, la membrana nuclear se hadesintegra, acabando por desaparecer al final de la profase. El nucleolo desaparece integrándose a los ribosomas.

3º. Los dos pares de centriolos emigran hacia los polos opuestos en relación al espacio nuclear, quedando unidos entre sí a través de las fibras de tipo proteínico, que tienen propiedades contráctiles. Dichas fibras establecen también dos puntos de contacto con los centrómeros de los cromosomas y forman un complejo estructural, llamado huso acromático.

f). METAFASE

Durante este período, los cromosomas se disponen en el ecuador de la célula mediante movimientos controlados por las fibras del huso.

La metafase es la etapa del ciclo de división celular que suele emplearse para el análisis citogenético.

g). ANAFASE

Las dos cromátidas iguales de que se compone cada cromosoma, se disocian y emigran hacia polos opuestos de las células [Miles 1980²¹]. En este movimiento participan las fibras del huso acromático, que tienen dos puntos de fijación, uno en el centriolo y otro en el centrómero, que al contraerse originan el movimiento migratorio de los cromosomas.

h). TELOFASE

En ella se completa la división celular [Sánchez 1982²²] mediante los siguientes procesos:

1º. Alrededor de las cromátidas, que durante la etapa anterior se reagrupan en los dos polos de la célula, se forma o reestructura la membrana celular. Simultáneamente la cromatina que se encontraba condensada en las cromátidas, se extiende ocupando los dos espacios nucleares. Los nucleolos de los dos núcleos empiezan a hacerse visibles.

2º. Para que la división celular se complete, los procesos que tienen lugar en el nucleolo se acompañan simultáneamente de un estrechamiento progresivo de la célula en su parte media, que acaba con la fusión de su membrana celular por dos polos opuestos.

Al proceso de la división y del reparto del citoplasma celular en dos partes se le denomina citocinesis y mediante él se completa la formación de dos células hijas, cada una de las cuales tiene la misma información genética que la célula madre.

1.5.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LOS CROMOSOMAS

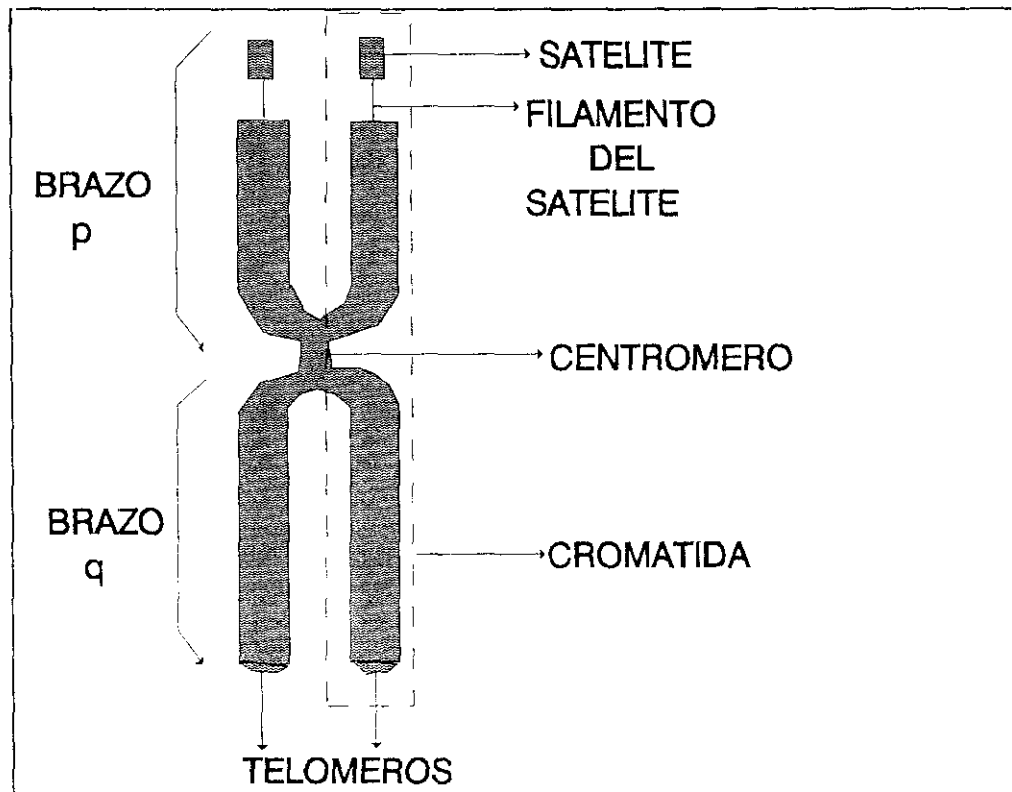
El descubrimiento de los cromosomas se debe a las investigaciones realizadas por Hofmeister en 1848. En 1954 [Fuhrmann 1970], Tjio y Levan⁷ establecieron el número exacto de cromosomas en la especie humana.

El cariotipo de un individuo (número y estructura de los cromosomas) puede conocerse con certeza a partir de los tejidos corporales fácilmente accesibles, como los linfocitos de sangre periférica o piel. Cada cromosoma puede identificarse por tinción específica de secuencias de ADN. Las técnicas de tinción generan unos patrones de bandas específicos para cada cromosoma.

La célula somática contiene 46 cromosomas dispuestos en 23 pares . De los 46 cromosomas, 44 son los 22 pares de autosomas y los otros dos son los cromosomas sexuales.

Los autosomas humanos se numeran del 1 al 22 y los cromosomas sexuales se conocen como "X" e "Y". Microscópicamente sólo puede distinguirse a 7 cromosomas por su longitud y por la posición del centrómero, pero sus características tintoriales exclusivas (tipos de bandas) permiten la identificación de todos ellos^{9,10,11,12,13} .

I.6.- PARTES DEL CROMOSOMA HUMANO



a). CROMÁTIDAS

Morfológicamente son dos estructuras cilíndricas paralelas entre sí, que se visualizan como tales en la etapa de metafase.

Cada una de ellas está constituida por una doble hélice de ADN rodeada de proteínas.

b). TELÓMEROS

Se llama telómero a las zonas distales de las cromátidas cuya función consiste en que un cromosoma no pueda adherirse a otro debido a la estructura molecular específica de estas regiones.

c). CENTRÓMERO

Es un estrechamiento o constricción que permite mantener unidas las cromátidas durante las etapas de profase y metafase. El centrómero divide al cromosoma en dos brazos denominados "**p**" (brazo corto) y "**q**" (brazo largo). Otra función del centrómero es servir de anclaje a las fibras del huso acromático y "tirar" de cada cromátide hacia cada uno de los polos celulares durante la etapa de anafase.

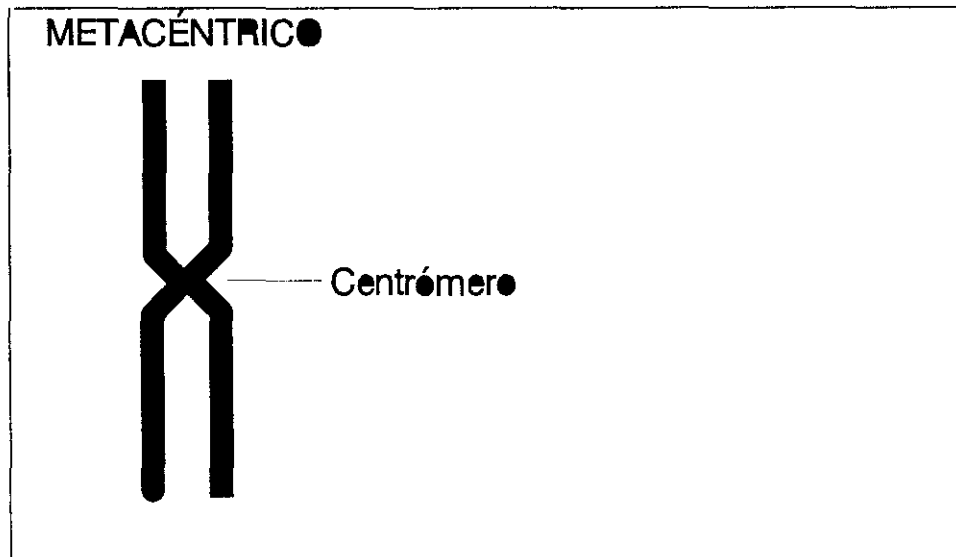
d). SATÉLITES

Son elementos morfológicos presentes en ciertos cromosomas.

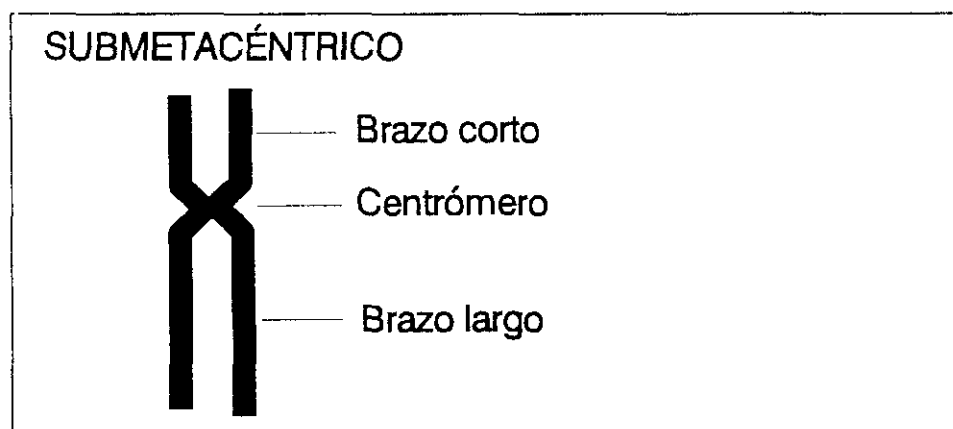
Se trata de un cuerpo redondeado, separado del resto del cromosoma por un filamento de ADN, el cual normalmente no se puede visualizar.

CLASIFICACIÓN DE LOS CROMOSOMAS

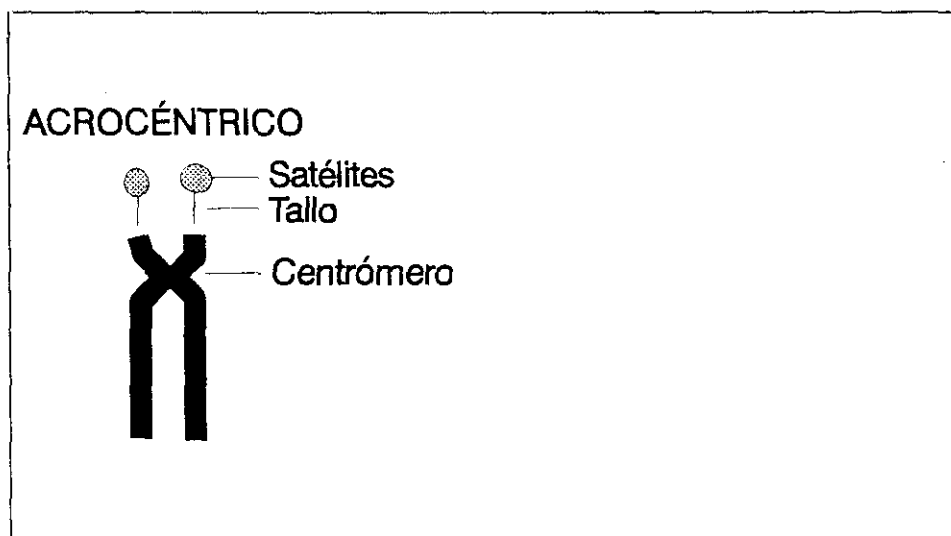
Los cromosomas se clasifican según la posición del centrómero^{9,10,11,12,13}.



a). Metacéntricos: Si el centrómero está localizado en la parte media del cromosoma dando lugar a que los brazos p y q sean sensiblemente iguales de tamaño.



b). Submetacéntricos: El centrómero está más cerca de uno de los extremos del cromosoma, dando lugar a un brazo más corto que otro.



c). Acrocéntricos: Cuando el centrómero está situado muy próximo a uno de los extremos, quedando un brazo corto muy reducido.

I.8.- CARIOTIPO HUMANO

Llamamos "cariotipo" a la ordenación de los cromosomas en función de su tamaño y de la localización del centrómero^{9,10,11,12,13,17}. Los cromosomas humanos se han ordenado en 7 grupos que se designan por letras:

GRUPO A: Son los cromosomas más grandes del cariotipo e incluyen a los pares 1, 2 y 3. El 1 y el 3 son metacéntricos, mientras que el 2 es submetacéntrico.

GRUPO B: Comprende los pares 4 y 5; son submetacéntricos y de morfología muy similar.

GRUPO C: A este grupo pertenecen los pares autosómicos 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 que son submetacéntricos. Por su tamaño se incluye en este grupo el gonosoma "X".

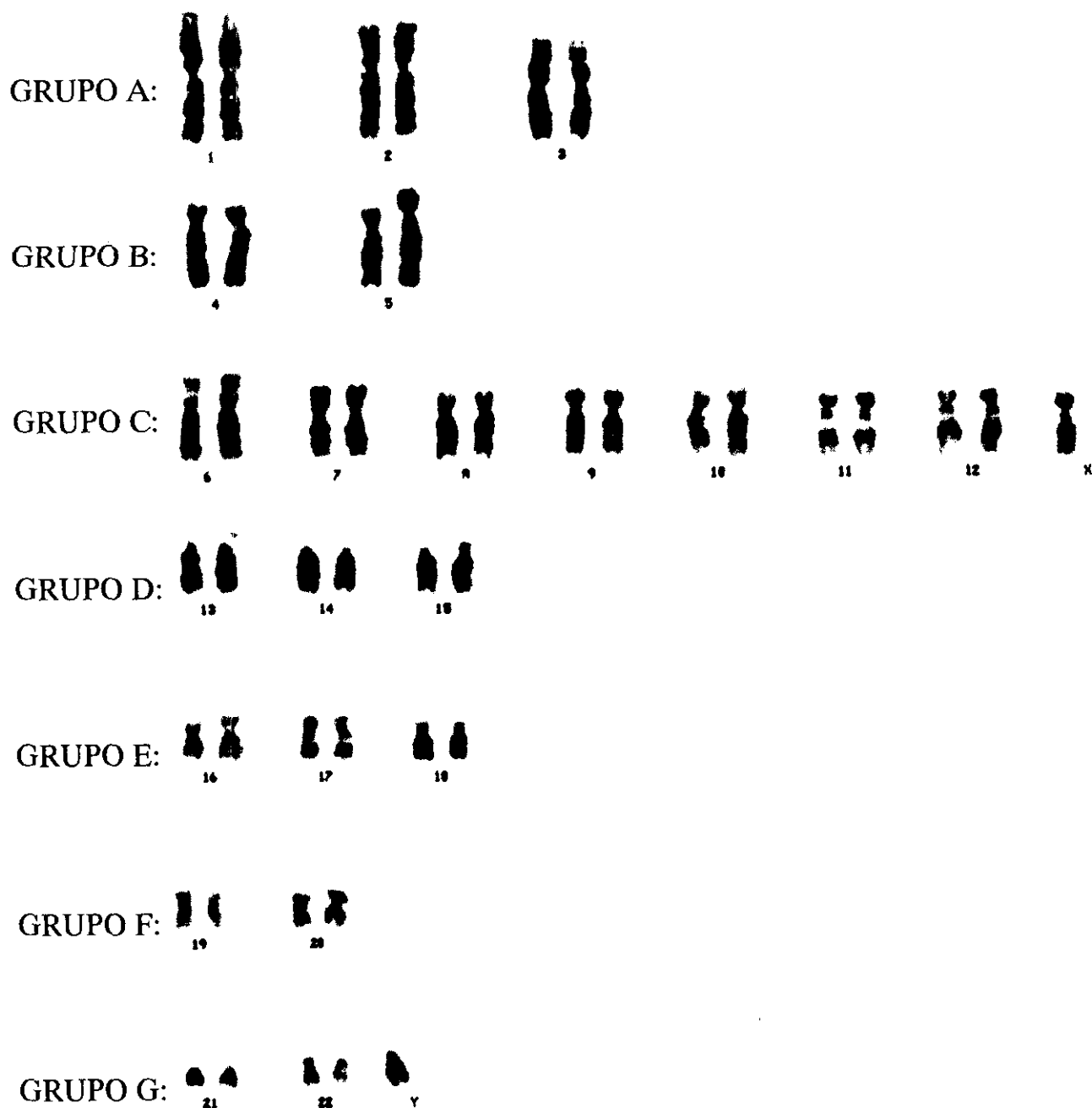
GRUPO D: Corresponden a este grupo los pares 13, 14 y 15, los cuales son acrocéntricos y presentan satélites en los brazos cortos.

GRUPO E: Comprende los pares 16, 17 y 18. Son cromosomas submetacéntricos, más pequeños que los del grupo C.

GRUPO F: Son los pares 19 y 20, y son metacéntricos pequeños.

GRUPO G: Está integrado por los pares 21 y 22, que son los más pequeños del cariotipo, acrocéntricos y con satélites. Se incluye por su tamaño, en este grupo, el gonosoma "Y " que, sin embargo, carece de satélites.

I.9.- ORDENACIÓN CROMOSÓMICA



I.10- DIFERENCIACIÓN CROMOSÓMICA

Los cromosoma se diferencian por su tamaño, y algunos aspectos de esta diferenciación pueden observarse microscópicamente.

El ADN establece enlaces con diversas proteínas de forma muy específica. El complejo ADN-proteínas, unido a cierta cantidad de ARN asociado, se conoce como cromatina. Se cree que la delicada estructura, la forma compacta en que se dispone el ADN e interacciona con las proteínas y la organización de la cromatina en el núcleo en interfase están relacionados con el control de la producción del ARN y de la replicación del ADN, y quizá también con la diferenciación celular.

Segmentos identificables con el microscopio y ubicados en los brazos cortos de los autosomas acrocéntricos se consagran en la producción de ARN ribosómico y nucleolos. A medida que avanza la mitosis, estas regiones organizadoras del nucléolo permanecen relativamente poco densas. Por esta razón, en la metafase se tiñen con menos intensidad y delimitan segmentos condensados de cromatina situados en posición distal en los brazos de los cromosomas (satélites). Otras regiones que permanecen relativamente no condensadas en la metafase, pueden ser reconocidas en unas pocas células y se conocen como zonas frágiles, porque pueden quedar interrumpidas (rotas) en preparaciones metafásicas.

Telómeros y centrómeros son otros ejemplos de especialización segmentaria a lo largo del cromosoma. Los telómeros, extremos distales de cada brazo, guardan cierta relación con la membrana nuclear y probablemente tengan importancia en el mantenimiento del orden del núcleo en la interfase, y para el apareamiento exacto de los homólogos en la meiosis. Las regiones centroméricas son los puntos de unión de los microtúbulos de la metafase^{15,17}.

I.11.- NOMENCLATURA

Dado que en las alteraciones estructurales interesa conocer los puntos de rotura y/o las partes del cromosoma duplicadas o perdidas, resulta útil conocer la nomenclatura de las bandas o listas cromosómicas, así como la representación gráfica de las mismas [Mitelman 1988²⁴].

Como ejemplo gráfico, la figura nº 1 muestra un cromosoma dividido por el centrómero en brazos cortos y largos. En B) se muestran las regiones o zonas características que actúan como puntos de referencia, y que dividen a los brazos cortos en una sola región, desde el centrómero hasta el extremo del brazo, y a los brazos largos en dos regiones: la 1 entre el centrómero y la banda característica, y la 2 entre ésta y el extremo del cromosoma.

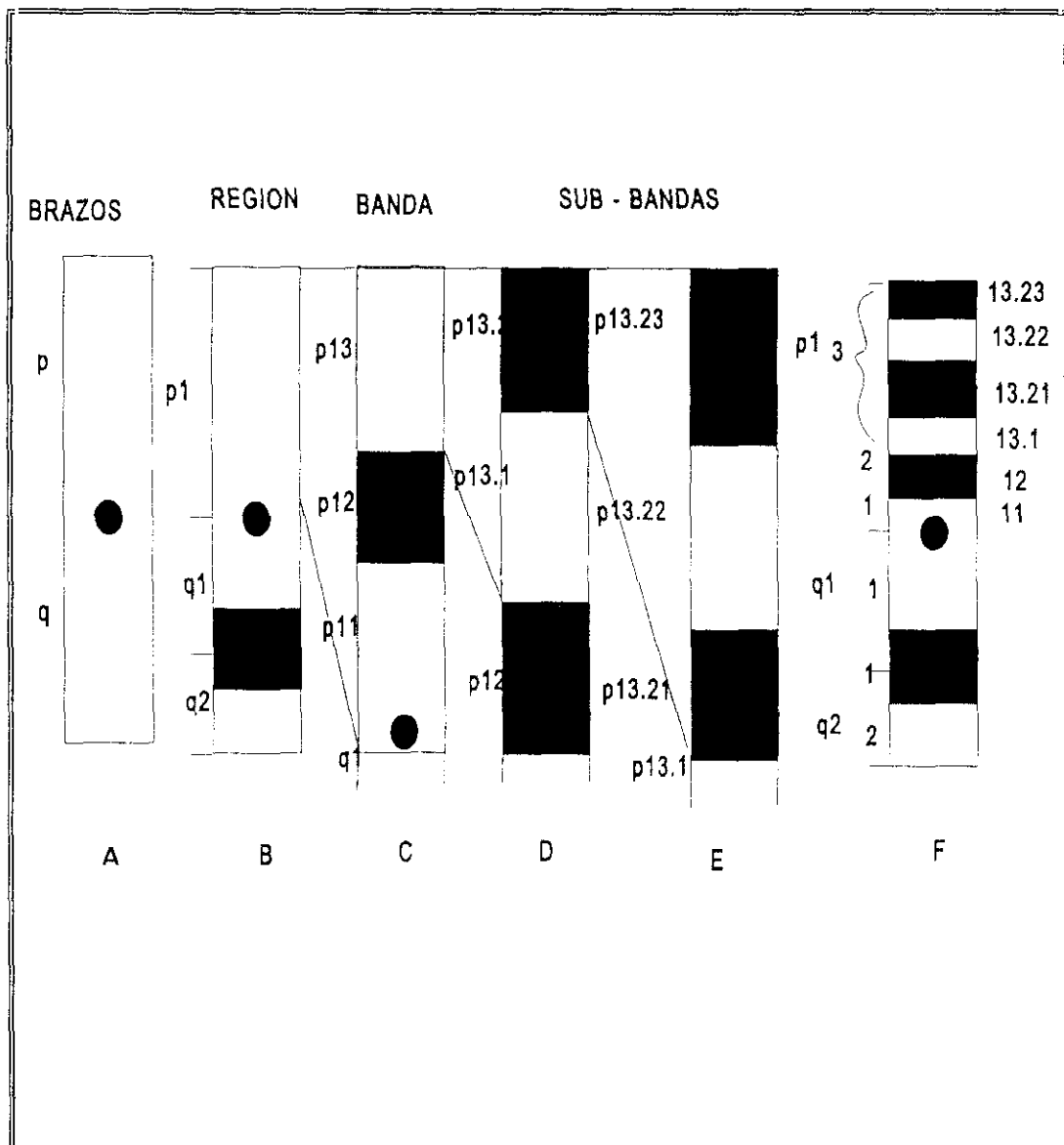
De este modo la expresión "p1" indica la región primera de los brazos cortos, y la "q1" y "q2" las dos regiones de los brazos largos. En C) se presentan tres bandas que se suponen están en la región 1 de los brazos cortos: a ellas les corresponden los números 1, 2 y 3 en sentido distal desde el centrómero. La forma de representación será: p11, p12 y p13 indicando, respectivamente, la lista 1 de la región 1, la lista 2 de la región 1 y la lista 3 de la región 1, todas pertenecientes a los brazos cortos del cromosoma. En D) se representan las subdivisiones de la banda 3; cada una se numera en sentido distal, 1 y 2. Su presentación gráfica será p13.1 para la primera subdivisión de la banda 3 de la región 1 del brazo corto y p13.2 para la segunda división de la banda 3 de la región 1 del brazo corto. Todavía cabe la posibilidad de expresar nuevas subdivisiones, como se observa en la fig.E), donde la subdivisión p13.2 tiene tres subdivisiones: su numeración sería, 1, 2, y 3, y su representación p13,21, p13,22 y p13,23 como se muestra en F).

La lista que actúa como región característica pertenece siempre a la región más distal; si nos referimos a los brazos largos de la fig.B), la lista característica pertenece a la región q2; sería la primera y por tanto su denominación sería q21. En la figura F) está presentado el brazo corto con las denominaciones de cada banda. La expresión o nomenclatura se realiza en la forma siguiente: en primer término va el número correspondiente al cromosoma, seguido de la letra correspondiente al brazo en que está la banda; seguidamente va el número correspondiente a la lista. En caso de existir divisiones en ella, el número de la subdivisión se pone, pero separado por un punto; si esta división presenta subdivisiones, el número de esta última se pone sin ninguna separación⁹.

Ejemplos:

- 2p13.24: se trata de la subdivisión 4 de la división 2 de la lista 3 de la región 1 de los brazos cortos del cromosoma 2.
- 13q12: Lista 2 de la región 1 de los brazos largos del cromosoma 13.
- 3q21.1: División 1 de la lista 1 de la región 2 de los brazos largos del cromosoma 3.

FIG. nº 1. ESQUEMA DE LA NOMENCLATURA DE LAS BANDAS



I.12.- NOMENCLATURA INTERNACIONAL EN CITOGENÉTICA

La nomenclatura utilizada se ajusta a las normas internacionales al respecto¹⁰. Dado que en las alteraciones estructurales interesa conocer los puntos de rotura y/o las partes del cromosoma duplicadas o perdidas, resulta útil conocer la nomenclatura de las bandas o listas cromosómicas, así como la representación gráfica de las mismas. En la tabla nº 1 manifestamos el significado de la nomenclatura utilizada en la literatura y en la tabla nº 2 presentamos los símbolos utilizados en citogenética humana.

TABLA nº 1. SIGNIFICADO DE LA NOMENCLATURA INTERNACIONAL.

- Número diploide:	Número de cromosomas de la célula somática normal (n=46).
- Número haploide:	Número de cromosomas del gameto normal (n=23).
- Euploidía:	Alteración numérica múltiplo del número haploide.
- Aneuploidía:	Alteración numérica que no es múltiplo del número haploide.
- Hiperploidía:	Número cromosómico aneuploide superior al diploide.
- Hipoploidía:	Número cromosómico aneuploide inferior al número diploide.
- Pseudodiploidía:	Número cromosómico diploide pero con alteración numérica o estructural.
- Número modal:	Número cromosómico más dominante en las células del tumor.
- Stemline:	Constitución cromosómica más frecuente en las células del tumor, ya numérico, ya estructurales.
- Sunline:	Hallazgos adicionales derivados de la principal (evolución clonal).
- Clon:	Población celular derivada de una sola; puede ser homogénea o no. Esta última por la aparición de subclones o células modificadas de la primera.
- Mosaico:	Presencia de dos o más clones celulares.
- Dobles diminutos:	Pequeños fragmentos cromosómicos adicionales.
- Deleción:	Rotura cromosómica y pérdida de fragmento.
- Traslocación:	Rotura en un cromosoma y unión del fragmento con otro cromosoma. Si se rompen dos cromosomas e intercambian los fragmentos se habla de traslocación recíproca.
- Cromosoma en anilla:	Rotura de los dos extremos del cromosoma que se unen con pérdida de los fragmentos separados.
- Cromosoma dicéntrico:	Se origina por la unión de dos fragmentos cromosómicos, portadores ambos de centrómeros.
- Inversión:	El cromosoma se rompe por dos puntos, volviendo a unirse tras girar 180°. Si está incluido el centrómero se denomina "pericéntrica", si no "paracéntrica".
- Duplicación:	Material repetido en un mismo cromosoma, ya por traslocación de su homólogo, ya por endoreduplicación de ese fragmento.
- Isocromosoma:	Cromosoma que tiene dos brazos cortos o dos largos; se origina por división transversal del centrómero.
- Tri-tetrarradial:	Figura resultante de la traslocación entre varios cromosomas.

Tabla nº 2. SIMBOLOS UTILIZADOS EN CITOGENÉTICA HUMANA.

A+G	Grupos cromosómicos	puz	Pulverización
1-22	Numeración de los autosomas	qr	Quadrirradial
X, Y	Cromosomas sexuales	s	Satélite
(/)	Símbolo de separación entre diferentes clones o líneas celulares	sce	Intercambio de cromátides hermanas
mos	Mosaico	cte	Intercambio de cromátides
chi	Diferentes líneas celulares	t	Traslocación
?	Dudas sobre un número cromosómico o su estructura	del	Delección
+o-	Aumento o disminución en número o en tamaño	der	Cromosoma derivado de diferentes alteraciones
p	Brazo corto del cromosoma	dup	Duplicación
q	Brazo largo del cromosoma	ins	Inserción
cen	Centrómero	rep	Traslocación recíproca
ace	Fragmento acéntrico	rec	Cromosoma recombinante
dic	Cromosoma dicéntrico con dos centrómeros	rob	Traslocación robertsoniana (fusión céntrica entre acrocéntricos)
tric	Cromosoma con tres centrómeros	tan	Traslocación en tandem
end	Endoreduplicación	ter rea	Reestructuración terminal (traslocación término - terminal)
h	Constricción secundaria	ter	Terminal (final del cromosoma)
i	Isocromosoma	:	Rotura sin reunión posterior (como en la delección)
inv	Inversión	.	Rotura y reunión posterior de...a...
mar	Cromosoma marcador no identificado	h	Constricción secundaria del cromosoma
mat	Origen materno	var	Variable (hace referencia a los cromosomas portadores de polimorfismo)
pat	Origen paterno	g	Gap: región no teñida con ligera desviación de cromátide o de un cromosoma
r	Cromosoma en anilla	;	Separación entre dos cromosomas o partes de ellos que tienen alteraciones estructurales en equilibrio
b	Rotura (break)	hsr	Región teñida homogénea
cs	Cromosoma		
ct	Cromátide		
min	Minute (pequeño fragmento cromosómico)		
mn:	Número modal		
ph	Cromosoma philadelphia		
prx	Proximal		
psu	Pseudo		

I.13.- ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

La constitución cromosómica de un individuo es normalmente constante en cuanto a número y morfología. Sin embargo, pueden producirse variaciones cromosómicas espontánea o artificialmente, que afectan a su estructura (y como consecuencia, a la disposición lineal de los genes) o bien a su número^{9,13,15,17}.

Las alteraciones cromosómicas (cromosomopatías), pueden ser de dos tipos:

- Numéricas
- Estructurales

a). ALTERACIONES NUMÉRICAS

Son aquellas variaciones que afectan al número de cromosomas de un individuo.

Se clasifican en:

ANEUPLOIDÍAS: Cuando afectan a un solo par del cariotipo.

- Trisomías
- Monosomías

POLIPLOIDÍAS: Cuando afectan a todos los cromosomas del cariotipo.

- Triploidías
- Tetraploidías

I.14.- MECANISMO DE PRODUCCIÓN DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

Las aneuploidías pueden originarse por la "no disyunción" meiótica, con lo cual un cromosoma determinado no emigra al polo correspondiente, formándose un gameto que tendrá un cromosoma extra, que si es fecundado dará lugar a un individuo trisómico.

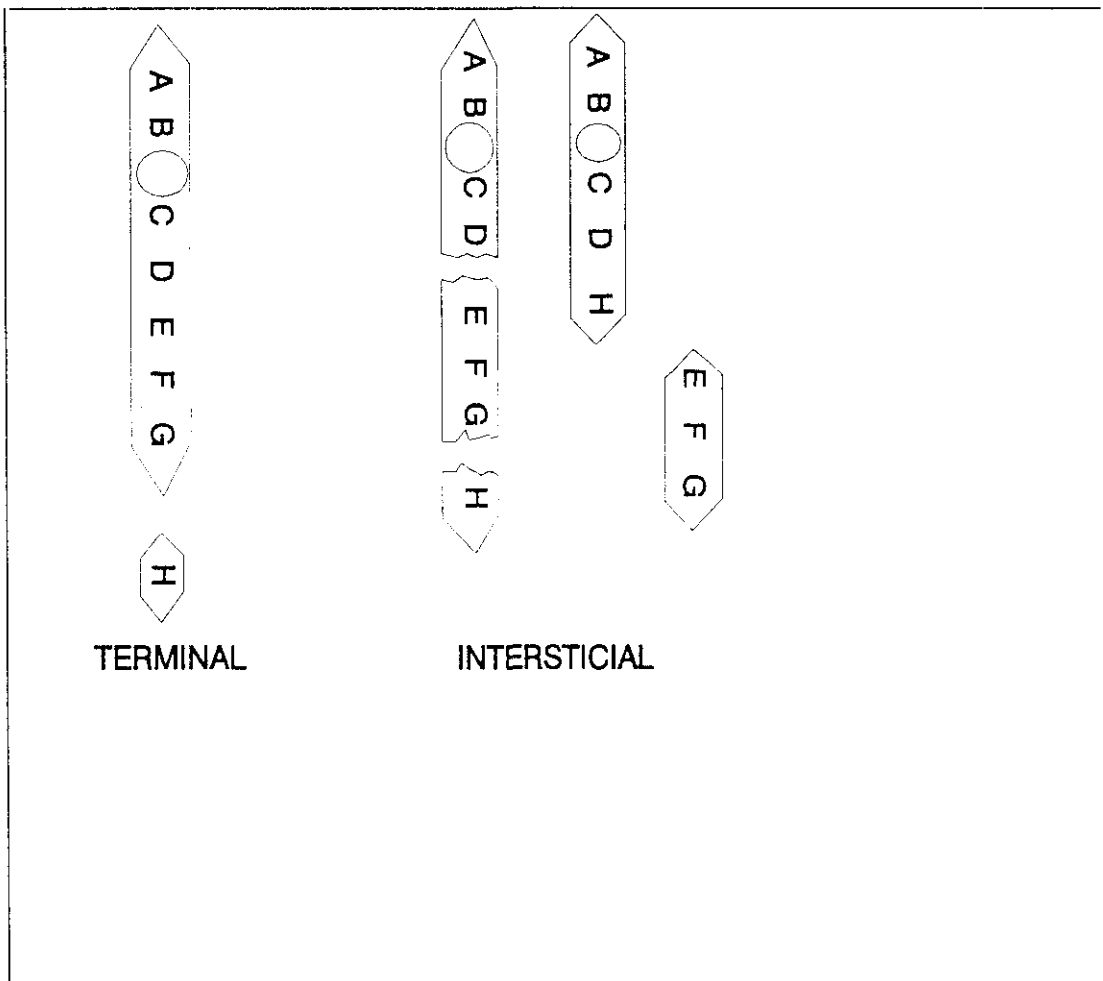
Las poliploidías pueden engendrarse por diversos mecanismos; probablemente las triploidías se originan por un fallo en la división de las células germinales y las tetraploidías se producen al fallar la primera escisión del cigoto.

I.15.- ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES

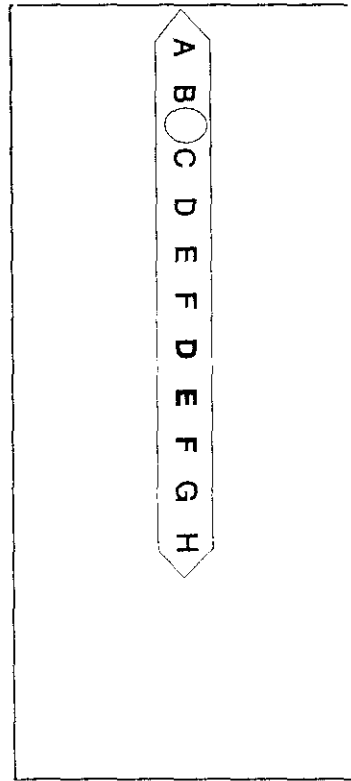
Como norma general, la dotación cromosómica de los individuos de una misma especie es constante en cuanto al número y a la morfología de sus cromosomas. Sin embargo, los cromosomas están expuestos a la acción de numerosos agentes ambientales que pueden producirles daños o fracturas. Estos agentes pueden ser de naturaleza física como las radiaciones, química como drogas; o biológica como virus. Cuando estos factores afectan a la estructura del cromosoma, se denominan **alteraciones cromosómicas estructurales** y podemos definir las como un cambio en la disposición lineal de los genes¹⁷.

Las alteraciones estructurales más frecuentes son:

- a). DELECCIONES: Alteración estructural que consiste en la pérdida de un segmento cromosómico y puede ser de dos tipos: – Intersticial
– Terminal



b). DUPLICACIONES: Se dice que hay una duplicación cuando un segmento o secuencia de genes aparecen repetidos dentro del mismo cromosoma.

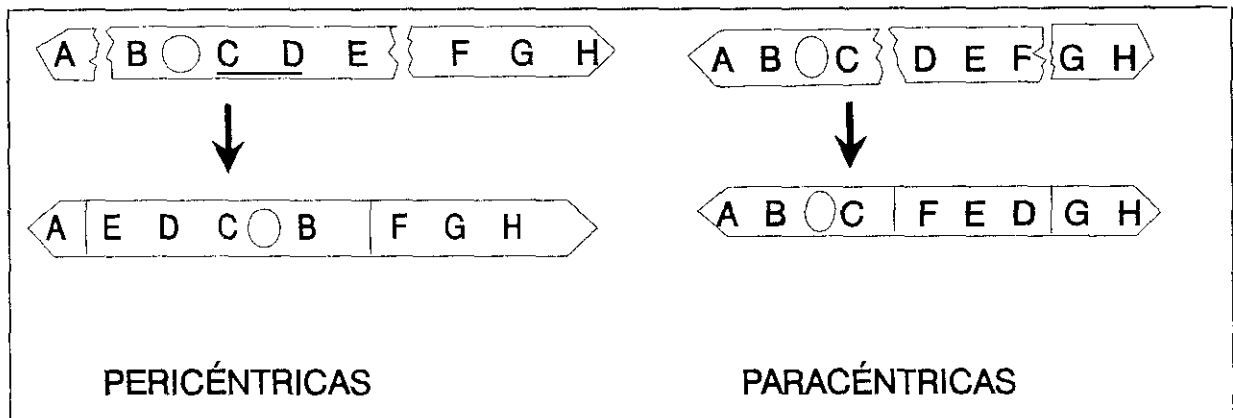


c). INVERSIONES: Estas alteraciones consisten en que un segmento o una secuencia de genes rota 180° sobre sí misma y se coloca en forma invertida, quedando la secuencia de genes alterada.

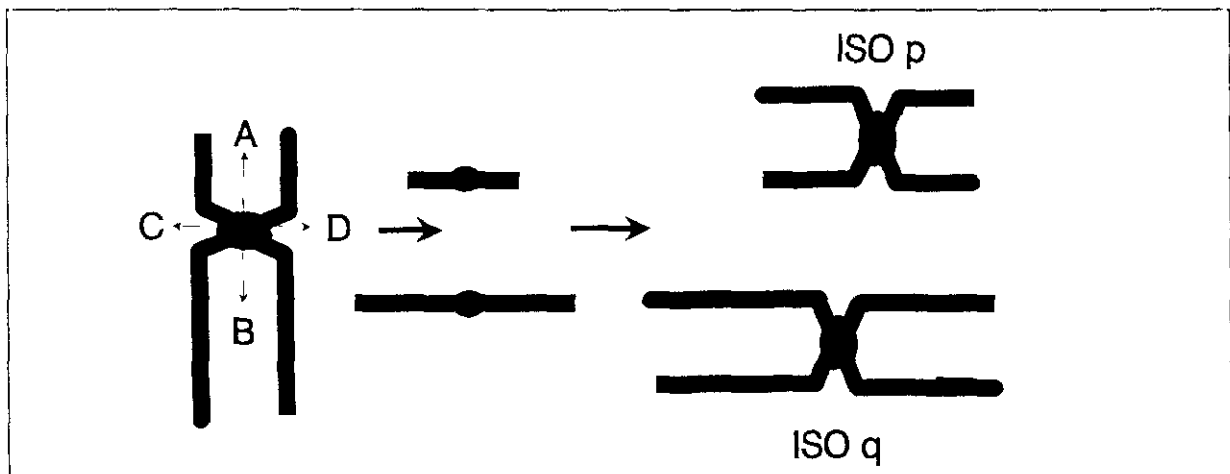
Hay dos tipos: – Paracéntricas.

– Pericéntricas.

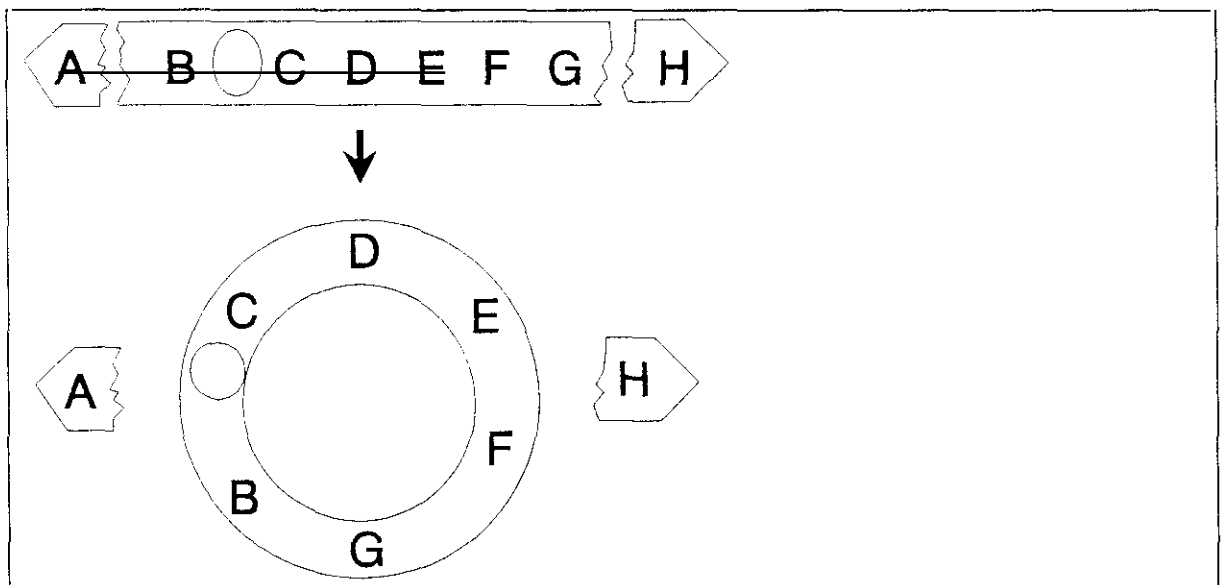
Llamamos **paracéntricas** a las inversiones de segmentos cromosómicos que no incluyen al centrómero y **pericéntricas** cuando el segmento cromosómico invertido incluye al centrómero.



d). ISOCROMOSOMAS: Se producen isocromosomas cuando el centrómero durante la anafase en vez de dividirse longitudinalmente, lo hace de forma transversal pudiéndose originar un isocromosoma de brazos cortos o un isocromosoma de brazos largos.

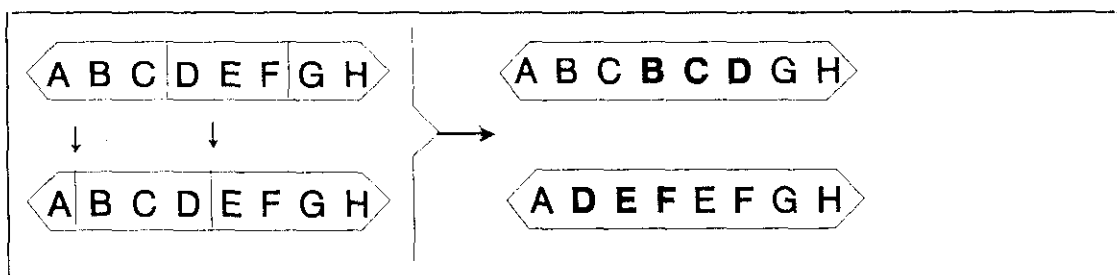


e). CROMOSOMAS EN ANILLO: Todos los cromosomas tienen en los extremos de los brazos cortos y de los brazos largos, unas estructuras llamadas **extremos no cohesivos**, cuya función consiste en que un cromosoma no pueda adherirse a otro. Algunas veces se producen deleciones de estos extremos en el mismo cromosoma, de forma que el extremo no cohesivo del brazo corto se pierde, al igual que el brazo largo; estos brazos se unen dando lugar a lo que se denomina cromosoma en anillo.

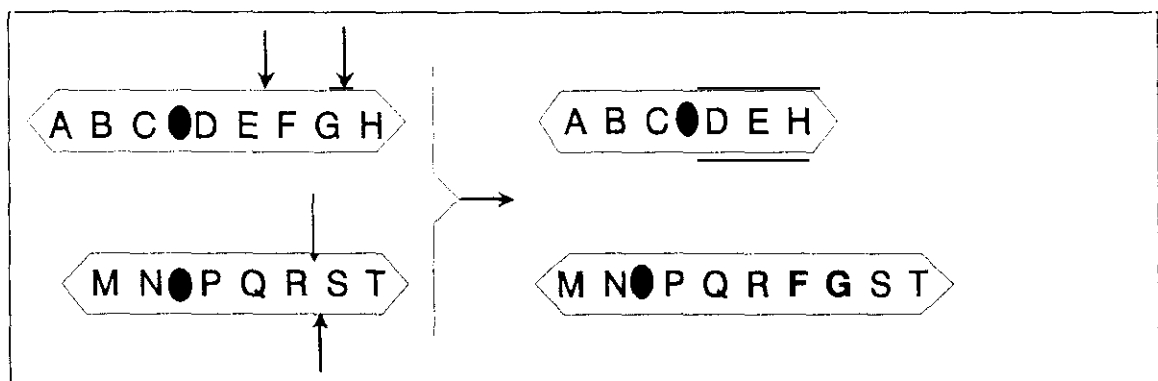


f. TRASLOCACIONES: Se denomina traslocación al cambio estructural, mediante el cual, un fragmento de un cromosoma se rompe y se adhiere a otro cromosoma. Pueden ser de tres tipos:

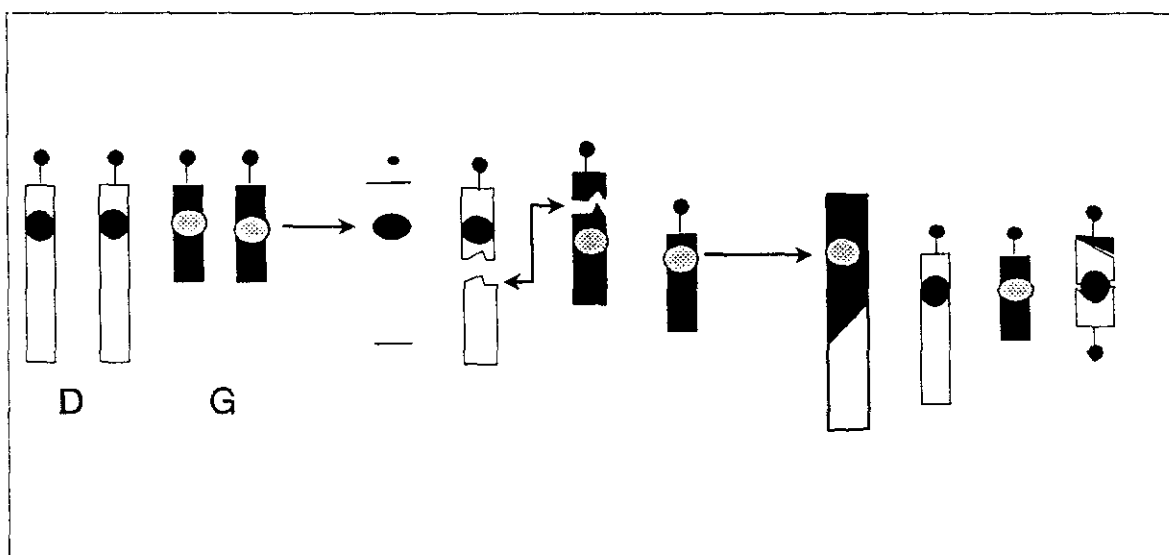
RECÍPROCAS: Cuando dos cromosomas se rompen e intercambian dos segmentos:



SENCILLAS: Cuando un cromosoma se rompe y la porción desprendida se adhiere a otro cromosoma, sin que haya intercambio de fragmentos:



ROBERTSONIANAS: Traslocaciones que se producen entre cromosomas acrocéntricos⁹ (grupo D y grupo G):



I.16.- ENFERMEDAD GENÉTICA

Las enfermedades genéticas se distribuyen en tres grupos:

- a) Trastornos cromosómicos en los que la falta, el exceso o la estructuración anómala de uno o más cromosomas causa deficiencia o exceso de material genético.
- b) Trastornos transmitidos por herencia mendeliana, simple o monogénica; los cuales están determinados, primordialmente, por un único gen mutante.
- c) Trastornos multifactoriales asociados por interacción de múltiples genes y múltiples factores exógenos o ambientales.

I.17.- ASPECTOS ÉTICOS

El diagnóstico genético aumenta cada vez más las posibilidades de lograr el diagnóstico prenatal y presintomático de muchas enfermedades y de la susceptibilidad a las mismas. Se puede diagnosticar en un recién nacido la poliposis familiar del colon, la enfermedad de Huntington o la poliquistosis renal dominante, decenios antes de que aparezcan los síntomas. ¿Qué efectos tendrán tales diagnósticos en el desarrollo psicológico de esas personas, en sus oportunidades profesionales y en las posibilidades de suscribir un seguro? También es probable que al diagnosticar una mayor susceptibilidad para las coronariopatías, la diabetes mellitus, el cáncer de colon o de mama, y otros procesos, haya más posibilidades de actuar terapéuticamente, aunque también de provocar ansiedad y discriminación.

L18.- ALTERACIONES CROMOSÓMICAS

EN PATOLOGÍAS MALIGNAS

En 1914, Boveri²⁰ ya sugirió que los cromosomas deberían intervenir de alguna manera en la transformación maligna de las células y expuso la teoría de que el cáncer era un problema celular monoclonal provocado por una alteración cromosómica. Tal sospecha fue confirmada en 1960 cuando Nowel y Hungerford²⁵ dieron a conocer la primera alteración cromosómica (cromosoma Philadelphia) hallado en una paciente afectada de Leucemia Mieloide crónica. A partir de entonces, se ha publicado mucho sobre los cambios cromosómicos en la Leucemia y en el uso de semejantes datos para definir y diagnosticar estas enfermedades y también han sido utilizados como factor pronóstico y de supervivencia de los pacientes afectados de un proceso maligno [Sandberg 1986²⁶ y 1992²⁷].

Salvo en casos excepcionales en los que la neoplasia aparece en individuos portadores de una alteración constitucional, todas las alteraciones cromosómicas de la célula tumoral son adquiridas por mutación somática (enfermedad genética somática) en una célula madre, a partir de la cual se va a originar un clon celular con la misma alteración constituyéndose un mosaico; en alguna célula del clon pueden producirse posteriormente otras alteraciones celulares [Trent 1989²⁸].

Para aceptar la presencia de un clon, se requiere que haya dos o más células con una misma alteración estructural o con el mismo cromosoma en exceso y tres o más células cuando se trata de la falta de un cromosoma. Una sola célula normal basta para aceptar un clon normal [Sandberg 1987²⁹].

Los avances en la genética han aportado nuevas luces en comprender los fenómenos etiológicos y la patogénesis de los tumores humanos [Heims 1989³⁰]

La aplicación de los métodos citogenéticos ha permitido el entendimiento de las neoplasias a un nivel de resolución previamente imposible [Sandberg 1987³¹]

La descripción de los cambios cromosómicos específicos ha ayudado a diagnosticar mejor los subtipos de los tumores, contribuyendo a una certera clasificación de los mismos (tabla nº 3).

Los cambios cromosómicos específicos reflejan un importante evento biológico a nivel celular que icide estrechamente en el pronóstico y supervivencia de los pacientes [Ballesta 1978³² y 1987³³].

Usualmente, los tumores sólidos contienen una multitud de cambios en el cariotipo y es muy difícil establecer el hecho citogenético primario, en contraste con la leucemia, en la que sólo se encuentra una alteración. Este enmascaramiento de los cambios cariotípicos primarios en los tumores sólidos continúa siendo el mayor obstáculo en averiguar semejantes eventos en un alto porcentaje de los mismos, sin embargo, con el tiempo y con el entusiasmo en estudiar un gran número de tumores de un órgano particular se han establecido cambios citogenéticos (cariotípicos) específicos [Gabas 1984³⁴]

TABLA nº 3. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS PRESENTES
EN NEOPLASIAS DEL HOMBRE

NEOPLASIA	ABERRACIÓN	REGIÓN
<u>Leucemia</u>		
* Granulocítica crónica	Traslocación	9q34 y 22 q11
No linfocítica aguda:		
* M1	Traslocación	9q34 y 22 q11
* M2	Traslocación	8q22 y 21 q22
* M3	Traslocación	15q22 y 17q11
* Linfocítica crónica	Trisomía	13
Linfocítica aguda:		
* L1 – L2	Traslocación	9q34 y 22q11
* L3	Traslocación	4q21 y 11q23
	Traslocación	8q24 y 14 q32
<u>Linfoma</u>		
* Burkitt	Traslocación	8q24 y 14q32
* Folicular	Traslocación	14q32 y 18q21
<u>Tumores solidos</u>		
Benignos:		
* Meningioma	Deleción	22q
* Leiomioma uterino	Traslocación	2q13–15 y 14q23–24
* Parótida, adenoma	Traslocación	3q25 y 8q12
* Paratiroides, adenoma	Traslocación	1q22 y 5q32
Malignos:		
* Sarcoma de Ewing	Traslocación	11q24 y 22q12
* Rabdomiosarcoma alveolar	Traslocación	2q35–37 y 13q14
* T. células germinales (test.)	Isocromosoma	12p
* Pulmón, células pequeñas	Deleción	3p13–23
* Liposarcoma mixoide	Traslocación	12q13 y 16p11
* Sarcoma sinovial	Traslocación	Xp11 y 18q11
* Neuroblastoma	Deleción	1p31 a 3p36
* Cistoadenoma de ovario	Traslocación	6p21y 14q24
* Retinoblastoma	Deleción	13q14
* Tumor de Wilms	Deleción	11p13

INTRODUCCIÓN

Un gran porcentaje de tumores sólidos tienen un índice mitótico muy bajo, por lo que es necesario cultivar las células del tumor a estudiar [Trent 1986³⁵].

Otro problema lo generan los propios cultivos, ya que con bastante frecuencia se contaminan con bacterias. Por otro lado, la calidad de los cromosomas no es siempre la mejor para el estudio citogenético. Afortunadamente, con la mejora y depuración de las técnicas de cultivo y bandeo de los cromosomas, se han logrado superar, en cierta medida, estos problemas. Existe otro problema a la hora de estudiar citogenéticamente los tumores sólidos y es que los cambios cromosómicos que se encuentran son tan diversos, que resulta difícil establecer si el cambio cromosómico es causa o efecto de las neoformaciones. Para evitar todos los cambios secundarios que nos enmascaran el cariotipo primario de la neoformación, es preciso estudiar el de un gran número de células [Limon 1986³⁶].

Las células malignas de una gran variedad de tumores, tienen o muestran anomalías cromosómicas; el defecto cromosómico más frecuente es la delección de una banda o una traslocación recíproca entre dos cromosomas. En pocas ocasiones se puede identificar una trisomía. Estas alteraciones en el cariotipo nos llevan a poder definir entidades con una patología determinada [Sandberg 1987³⁷].

I.19.- IMPORTANCIA DE LOS CAMBIOS CROMOSÓMICOS EN LOS TUMORES BENIGNOS

La variabilidad cromosómica de los tumores benignos es bastante limitada cuando se compara con la de los tumores malignos. El bajo grado mitótico es el principal factor limitante. Se acepta, generalmente, que los tumores benignos tienen una constitución normal (diploide), sin embargo, los descubrimientos citogenéticos anormales en tumores considerados benignos, desde el punto de vista histológico y de comportamiento, presentan un serio dilema para los Citogenetistas oncológicos, que consideran de suma importancia el papel que juegan las anormalidades cromosómicas en las neoplasias malignas. De esta manera los Citogenetistas se enfrentan a una cuestión fundamental: si actualmente se acepta que las anormalidades cromosómicas indican malignidad, ¿tendríamos entonces que aceptar que todos los tumores benignos con anormalidades cromosómicas deban considerarse premalignos, o que en el momento del diagnóstico se encuentren actuando como una entidad maligna?

Los adenomas del colon, meningiomas, tumores de las glándulas salivares, paratiroides y lipomas son todos entidades benignas en las cuales se han encontrado cambios cromosómicos consistentes y, por lo tanto, forman buenos ejemplos a discutir.

Se han observado cambios cromosómicos, esencialmente numéricos, en adenomas benignos del colon, ya sean tubulares o vellosos [Reichmann 1985³⁸]. También, se han descrito cambios idénticos, tales como trisomía 8 y 12 en el carcinoma del colon [Becher 1983³⁹ y Levin 1986⁴⁰], aunque asociados a otros cambios cariotípicos. Por lo tanto es tentador correlacionar la presencia de las

anormalidades cromosómicas en los adenomas, como una entidad premaligna y el porcentaje de adenomas con anormalidades cromosómicas sería el porcentaje de aquellos adenomas con alto riesgo de transformación maligna. Desafortunadamente, los pocos casos citogenéticamente investigados no permiten conclusiones precisas.

Los meningiomas son el grupo de neoplasias benignas que han sido más extensamente estudiadas citogenéticamente [Zang 1982⁴¹]. De todos los tumores estudiados hasta ahora la mitad presentan una anormalidad cariotípica específica. La pérdida de un cromosoma 22 se observa en todos los tipos histológicos, pero con una frecuencia variable y en correlación con el comportamiento clínico del meningioma.

Por otro lado, también se observan frecuentemente cambios numéricos adicionales en el meningioma, y otra vez este hecho, se correlaciona con su potencial invasivo. Destaca el hecho de que en estos tumores benignos, la aparición de las subpoblaciones celulares con aberraciones cromosómicas adicionales, está relacionado con un comportamiento más agresivo.

Considerando el gran número de meningiomas que han sido citogenéticamente investigados, se esperaría encontrar entre ellos por lo menos un ejemplo de franco tipo invasivo, un meningioma sarcomatoso. Sin embargo, los cambios cromosómicos en meningiomas están claramente asociados con su comportamiento clínico, que podría ser más o menos agresivo, pero que se mantiene entre los límites de lo que se entiende como benignidad. En otras palabras, en los meningiomas, los cambios cromosómicos no necesariamente significan una transformación maligna.

Han sido estudiados citogenéticamente 60 tumores de glándulas salivares (adenomas pleomorficos) por un grupo sueco [Mark 1983⁴²]. El 40% de éstos, tenían un patrón anormal. Las anormalidades cromosómicas consistían generalmente en cambios estructurales bastante simples, del tipo de traslocación o supresión involucrando preferentemente regiones de los cromosomas 3, 8 y 12. Estas fueron las primeras traslocaciones cromosómicas primarias descritas en entidades benignas.

Teniendo en cuenta el posible "*mal juego*" de los cambios cariotípicos primarios en entidades malignas, los tumores de las glándulas salivares mixtos son de interés especial, porque no se ha encontrado ninguna correlación entre las anormalidades cromosómicas específicas y el comportamiento del tumor [Thackray 1974⁴³].

Un punto importante a discutir sería la relación entre el cambio primario y los cambios secundarios en el cariotipo, puesto que ésto puede ser la causa de la transformación de un tumor no agresivo a un estado invasivo. Un ejemplo es lo que ocurre con la patogénesis de los lipomas y liposarcomas [Turc-Carel 1986⁴⁴, Limon 1986⁴⁵ y Heim 1986⁴⁶]. En ambos hay una traslocación que afecta a parte de un cromosoma 12, pero con diferentes puntos de rotura, mientras que en el lipoma tenemos una traslocación (3;12) como más frecuente. En el liposarcoma mixoide aparece la traslocación (12;16) [Turc-Carel 1986⁴⁷, Sreekantaiah 1991⁴⁸ y Karakousis 1987⁵⁰]. Esta traslocación ha sido muy útil a la hora del diagnóstico diferencial, ya que sus histologías son bastante similares y además es crucial para determinar lo que ocurre a un nivel molecular, ya que en el caso del

lipoma la proliferación celular no es maligna y en el caso del liposarcoma mixoide se desarrolla un tumor maligno. Hoy en día, el significado de las anormalidades cromosómicas en los tumores benignos no puede generalizarse. En algunos casos tales anormalidades pueden ser un indicio de transformación maligna, indicando que la proliferación benigna ha llegado a ser premaligna. En otros casos, la presencia de anormalidades citogenéticas es compatible con una proliferación benigna no ambigua, con o sin una influencia sobre el comportamiento de la proliferación (invasión o recurrencias) sin tener en cuenta si algunas de las anormalidades son propensas a la malignidad.

I.20.- CITOGENÉTICA EN EL ADENOMA PARATIROIDEO

El estudio de la incógnita relativa a si las neoplasias provienen de una célula sencilla (monoclonal) o de varias células (policlonal), proporcionó pistas importantes para estudiar su origen.

Se cree que los tumores monoclonales resultan de una mutación poco frecuente o una acumulación de defectos en una sola célula somática.

Los tumores de origen policlonal pueden resultar de procesos que afectan a múltiples células, tal como la susceptibilidad hereditaria para la formación de un tumor o como respuesta a una excesiva estimulación endógena o exógena.

Entre los más importantes resultados de las aplicaciones de los métodos genéticos modernos en biomedicina, está el estudio de las neoplasias, que a su vez, sin lugar a duda, han impulsado la investigación de las bases citogenéticas de la enfermedades.

Algunos pacientes, en especial aquellos con un síndrome neoplásico endocrino, tienen una predisposición hereditaria particular hacia los tumores.

Los síndromes tumorales hereditarios pueden ser vistos como un caso especial, en el cual las mutaciones son una clave genética que está ya presente en cada célula somática desde su nacimiento.

Se han proporcionado nuevos principios generales, tan importantes para la tumorigénesis endocrina como para otras neoplasias [Arnold 1994⁵¹]. Un ejemplo es la demostración de que los adenomas paratiroides son neoplasias monoclonales y no formas asimétricas de hiperplasia policlonal.

Existen características especiales en las enfermedades paratiroideas cuya explicación podría implicar mecanismos únicos. Por ejemplo, en los pacientes con adenomas paratiroideos (enfermedad de glándula única) e hiperplasia primaria, en los cuales la secreción de la hormona paratiroidea está estrechamente emparejada con el nivel de calcio en la célula paratiroidea, es posible de que el defecto proliferativo sea primario. Sin embargo, en otros puede iniciarse la proliferación como una reacción programada normalmente de la célula paratiroidea a un estímulo hipocalcémico que luego se presenta como resultado de un conjunto de mutaciones.

La readaptación de genes cromosómicos es un mecanismo común de activación oncogénica. Ocasionalmente estas readaptaciones son citogenéticamente detectables en el *cariotipo* de las células tumorales [Arnold 1994⁵¹].

La expresión citogenética se caracteriza por roturas cromosómicas en puntos específicos y es allí donde se han descubierto numerosos oncogenes humanos adyacentes [Arnold 1994⁵¹, Yoshimoto 1991⁵² y Thakker 1993⁵³]. Un buen ejemplo es el oncogen BCL2 que fue descubierto cerca del punto de rotura de la traslocación cromosómica en linfomas foliculares de células B [Motokura 1991⁵⁴].

Se ha demostrado en tejido paratiroideo una pérdida de alelos en el cromosoma 11 que pueden constituir genes supresores (oncogenes). Esta alteración puede ser responsable de la tumorogénesis del hiperparatiroidismo primario [Byström 1990⁵⁵]. Se han observado readaptaciones genéticas interesantes en la región del gen PTH de algunos tumores paratiroideos que parece constituir el área de interacción genómica de la vitamina "D" y contiene

genes de crecimiento y de posible importancia en la formación del tumor [Arnold 1989⁵⁶ y Friedman 1990⁵⁷].

Se ha demostrado también la pérdida de alelos en los adenomas paratiroides esporádicos, lo que parece confirmar el origen monoclonal de estas neoplasias [Friedman 1992⁵⁸]. Sin embargo, la demostración de la misma aberración genética en la hiperplasia del MEN I implica la existencia de aberraciones semejantes en ambas entidades histológicas. Que estos resultados encajen en una teoría en la cual se sugiera que el hiperparatiroidismo, especialmente en individuos de edad avanzada, pueda estar relacionado con una deficiencia relativa de vitamina "D"; está aún por demostrar [Arnold 1992⁵⁹ y Larsson 1988⁶⁰].

Örndal⁶¹ (1990), analizó 157 metafases (células) de un adenoma paratiroideo, en este estudio estableció un clon t(1;5)(p22;q32), siendo esta traslocación la única referencia en la literatura en estudios citogenéticos.

Existen muchas preguntas formuladas en la literatura que necesitan ser contestadas.

¿Cual es la relación citogenética y/o molecular entre ser expuesto a irradiación del cuello y el incremento en el desarrollo de tumores paratiroides?.

¿Cuales son los factores hormonales y otros que se relacionan con el incremento en la frecuencia de hiperparatiroidismo en mujeres postmenopáusicas?

¿Por qué el carcinoma paratiroideo es una enfermedad tan rara en comparación con formas benignas de hiperparatiroidismo?.

¿El carcinoma paratiroideo se desarrolla de un adenoma preexistente?.

¿Cual es la explicación a la alta penetración de hiperparatiroidismo en el síndrome neoplásico endocrino múltiple del tipo I (MEN I), en contraste con la baja penetración en el MEN 2-a y su ausencia en el MEN 2-b?.

I.21.- ANORMALIDADES EN OTRAS GLÁNDULAS

ENDOCRINAS

Se han descrito anormalidades cromosómicas en nueve adenomas de glándulas endocrinas. Se encontraron anormalidades numéricas en un adenoma pituitario [Rey 1986⁶²]. Los otros ocho fueron en adenomas tiroideos, dos de los cuales presentaron solo aberraciones numéricas, con trisomía 4 y tetrasomía 7 [Bondeson 1989⁶³]; dos presentaron una simple aberración estructural: uno presentó t(9;2) y otro presentó t(10;19)(q22p13 ó q13) [Bartnitzke 1989⁶⁴]. Los cuatro adenomas restantes tuvieron ambos ordenamientos estructurales afectando a los cromosomas 1,2,3,8,9,10,13,15, y 19 con varios cambios numéricos [Bondeson 1989⁶³ y Antonini 1988⁶⁵].

I.22.- FISIOLÓGÍA CELULAR Y FISIOPATOLOGÍA

DE LAS GLÁNDULAS PARATIROIDES

La concentración extracelular de calcio iónico (Ca^{2+}) constituye el principal regulador fisiológico de la liberación de la hormona paratiroidea (PTH) [Sherwood 1966⁶⁶ y Brown 1982⁶⁷].

Los estudios in vitro e in vivo han revelado que el calcio ejerce una acción inhibitoria en la secreción hormonal de las células paratiroides de una gran variedad de especímenes incluyendo el hombre [Habener 1976⁶⁸ y Rudberg 1982⁶⁹]. Esta relación es la responsable del estrecho mantenimiento de los valores de calcio plasmático, consecuente a la acción fisiológica de la PTH, que implica la rápida movilización del calcio, aumentando su reabsorción tubular renal, así como la liberación de calcio por el hueso, al tiempo que incrementa la reabsorción intestinal de calcio estimulando la producción de 1,25 dehidroxivitamina D a nivel renal [Habener 1984⁷⁰].

La regulación de la secreción hormonal por la células endocrinas generalmente implica la transducción de signos extracelulares a través de sistemas mensajeros secundarios, tales como el Ca^{2+} citoplasmático y el adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y así como la producción de diacilglicerol por intermedio de la hidrólisis de fosfoinositol [Rubin 1970⁷¹ y Wallach 1987⁷²].

La extraordinaria dependencia entre los niveles de calcio y la secreción de la PTH sugiere un mensajero distinto al Ca^{2+} , puesto que el calcio es un estimulador universal y no un inhibidor de la secreción, tal como sucede en las paratiroides [Rubin 1970⁷¹ y Douglas 1968⁷³].

Aunque se sabe que el calcio intracelular interactúa con la producción del AMPC y en el rendimiento de fosfoinositol de la células paratiroides [Brown

1982⁷⁴ y Kobayashi 1988⁷⁵], no existen argumentos inequívocos de que el Ca^{2+} es el modulador principal de la PTH. Es igualmente evidente que los mensajeros celulares pueden interactuar sinérgicamente en algunas células y antagonísticamente en otras.

Se ha comprobado que varios factores, además del calcio, interfieren en las células paratiroides con la producción de AMPc, que actúa como un estimulador de la liberación de la PTH pero con efectos principalmente relacionados con la PTH previamente almacenada [Brown 1982⁷⁴ y Morrissey 1979⁷⁶]. Sin embargo no es posible que el AMPc intervenga o sea responsable de la regulación de calcio y de la secreción de hormona [Morrissey 1979⁷⁶ y Lasker 1982⁷⁷]. Descubrimientos más recientes han aclarado que los aumentos en el calcio extracelular evocan una señal celular mediante la activación de un mecanismo receptor del calcio en la membrana de la célula paratiroidea [Gylfe 1986⁷⁸ y Juhlin 1987⁷⁹].

La transducción de la señal externa involucra un aumento bifasico de Ca^{2+}_i y una hidrólisis concomitante de fosfoinositol que se traduce en la inhibición de la liberación de la hormona [Brown 1987⁸⁰, Gylfe 1987⁸¹ y Kifor 1988⁸³]. Además es bien sabido que el defecto de regulación de la secreción por el calcio extracelular constituye el principal trastorno en el hiperparatiroidismo primario (HPTp) y que se halla asociado a una disminución en la regulación del mecanismo receptor de calcio paratiroideo funcionalmente importante [Brown 1978⁸³ y 1982⁶⁷, Larsson 1984⁸⁴ y Aston 1988⁸⁵].

I.23.- REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE LA HORMONA PARATIROIDEA POR CALCIO EXTRACELULAR

Las influencias del calcio (Ca) extracelular en la liberación de hormona paratiroidea en células paratiroides normales son virtualmente momentáneas y están caracterizadas por una relación sigmoidal inversa dosis-respuesta [Brown 1983⁸⁶ y Wallfelt 1988⁸⁷].

Esta interrelación infiere que las alteraciones menores en el nivel de Ca pueden igualmente inducir respuesta secretora considerable y que la tasa máxima de liberación de hormona puede lograrse más bien por reducciones limitadas en la concentración catiónica. Los cambios más repentinos en el nivel de Ca parecen provocar respuestas secretoras más importantes [Adami 1982⁸⁸, Grant 1990⁸⁹]. Estos datos sugieren que la disminución más acelerada y probablemente más severa del Ca plasmático es contrarrestada con mayor eficacia. Parece persistir una porción no suprimible de la secreción de la PTH a pesar de valores altos de Ca extracelular, aunque la magnitud de esta fracción puede depender de la habilidad de los inmunoensayos para identificar las diferentes partes de la molécula de la PTH [Wallfelt 1988⁸⁷, Cantley 1985⁹⁰ y Aston 1988⁸⁵].

La regulación de la secreción de la hormona por Ca extracelular involucra principalmente la liberación de hormona, capaz de evitar los gránulos de almacenamiento que se encuentran en número limitado en las células paratiroides [Morrissey 1980⁹¹, MacGregor 1975⁹² y Dietel 1980⁹³].

La rapidez de de los factores que influyen en la secreción sugiere interferencia principalmente con el mismo proceso de liberación. La degradación intracelular con liberación de fragmentos carboxiterminales de hormona paratiroidea ocurre normalmente a altas concentraciones de Ca extracelular [Mayer 1979⁹⁴ y Morrissey 1980⁹¹], reduciendo así la bioactividad de la hormona liberada. La secreción puede, sin embargo, ser modulada durante períodos más prolongados de tiempo, mediante acciones en la transcripción del gen de la PTH. La hormona es sintetizada como una molécula precursora que experimenta una división posterior [Cohn 1981⁹⁵]. Los niveles de RNA mensajero pre-pro hormona paratiroidea se reducen por una alta concentración de Ca extracelular, así como también por la 1,25 dihidroxivitamina D [Sherwood 1987⁹⁶ y Russell 1983⁹⁷]. La inhibición de la liberación de la PTH por la vitamina D activada ha quedado demostrada tanto in vivo como in vitro [Nygren 1988⁹⁸ y Delmez 1989⁹⁹], y parece resultar de la unión de 1,25 dihidroxivitamina D a los receptores intracelulares y a la interacción con la región promotora del gen PTH [Okazaki 1988¹⁰⁰]. Estas observaciones son interesantes ya que la 1,25 dihidroxivitamina D es considerada tanto un agente etiológico como terapéutico en el hiperparatiroidismo [Akerström 1991¹⁰¹].

I.24.- REGULACIÓN DE LA LIBERACIÓN DE **LA PTH EN EL HIPERPARATIROIDISMO**

La regulación de la liberación de la PTH por el Ca extracelular se halla perturbada en todo tejido paratiroideo patológico, ya estén asociados a un trastorno de tipo adenomatoso o hiperplásico primario, hiperparatiroidismo familiar con síndrome endocrino múltiple (MEN), a un hiperparatiroidismo secundario o bien a un carcinoma paratiroideo [Wallfelt 1988¹⁰², Brown 1979¹⁰³, Nygren 1988¹⁰⁴ y Benson 1987¹⁰⁵].

El aumento en la concentración del calcio extracelular constituye la señal fisiológica primaria para inhibir la liberación de la PTH [Larsson 1986¹⁰⁶ y Wallfelt 1988¹⁰⁷].

La transducción de la señal externa que induce una respuesta celular implica la activación de un mecanismo receptor catiónico de la membrana de la célula paratiroidea con aumento de la concentración citoplásmica de calcio [Nygren 1987¹⁰⁸]. Este receptor de calcio juega un papel clave en la homeostasis general del mismo. La unión del calcio extracelular al receptor se asocia con movilización del calcio intracelular y con paso del calcio a la célula. Este fenómeno interfiere con el proceso de estimulación sobre la transcripción genética de la PTH [Larsson 1985¹⁰⁹ y Wallfelt 1985¹¹⁰].

El aumento del calcio extracelular provoca sobre los receptores de membrana un cierto grado de insensibilidad frente a los estímulos fisiológicos y, en consecuencia, sobre la secreción de la PTH en los estados de hiperparatiroidismo, disfuncionalidad que se asocia con una alteración de la homeostasis cálcica intracelular. Por lo tanto el grado de inestabilidad de los receptores de membrana que el calcio provoca se correlaciona con la intensidad

de la hipercalcemia en el hiperparatiroidismo [Brown 1987¹¹¹ y Brown 1989¹¹²].

Existen pruebas de que la anormalidad funcional de la célula puede ser más pronunciada en glándulas más grandes en comparación con las más pequeñas, así como en las porciones nodulares comparadas con las zonas de crecimiento difuso de tejido paratiroideo hiperplásico [Benson 1987¹⁰⁵ y Wallfelt 1988⁸⁷]. De hecho, en pacientes urémicos sometidos a cirugía paratiroidea, se ha descubierto una hiperplasia nodular asimétrica concomitante con regulación hormonal alterada principalmente en uno o unos cuantos nódulos dominantes [Wallfelt 1988⁸⁷]. Estas observaciones proveen las bases para la selección del autotransplante paratiroideo durante la paratiroidectomía total en casos de hiperplasia primaria, secundaria y en hiperparatiroidismo debido a un MEN 1, puesto que el autotransplante con tejido menos alterado puede reducir la incidencia de recidivas en el tejido trasplantado.

El Ca^{2+}_i es pobremente regulado en la célula paratiroidea oxifílica en comparación con células principales de la misma glándula [Johansson 1989¹¹³]. Otro resultado sorprendente de los estudios del tejido paratiroideo humano es la presencia de una sensibilidad disminuida del Ca^{2+}_i en células principales de las glándulas de tamaño normal asociadas con adenomas únicos [Johansson 1989¹¹³].

I.25.- PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS PARATIROIDEAS

El hiperparatiroidismo se halla asociado al incremento de la masa de las células del parénquima paratiroideo. Este aumento puede contribuir a la hipercalcemia en estos pacientes después de que la liberación de PTH haya sido suprimida por el Ca extracelular [Rudberg 1982⁶⁹, Wallfelt 1988¹⁰² y Brown 1983¹¹⁴].

El peso del parénquima celular puede, sin embargo, estar sólo ligeramente elevado y la hipercalcemia puede ser aliviada tras la extirpación de un adenoma que pese menos que el resto del tejido paratiroideo normal. Esto demuestra que la regulación secretora alterada, más bien que la proliferación celular aumentada, constituye la principal causa de hipercalcemia en el hiperparatiroidismo [Akerström 1991¹⁰¹].

Se conoce muy poco acerca de la regulación de la proliferación de células dentro de las glándulas paratiroides. El parénquima parece estar equipado con receptores del factor de crecimiento epidérmico y otros factores diversos de crecimiento [Duh 1986¹¹⁵]. Las células principales y oxifílicas de las glándulas paratiroides humanas normales y anormales secretan un péptido paratiroideo de origen hormonal en su membrana superficial, que en la vida adulta puede ejercer funciones paracrinas hasta hoy desconocidas [Hellman 1990¹¹⁶]. Su liberación por las glándulas paratiroides fetales parece mantener la transferencia de Ca placentario y la hipercalcemia fetal durante las últimas etapas del embarazo [Rodda 1988¹¹⁷].

Los estudios *in vitro* de cultivos celulares han mostrado que la hipocalcemia mantenida estimula la reproducción de células paratiroides [Sakaguchi 1987¹¹⁸]. Esto puede tener importancia en cuanto al crecimiento inevitable de las glándulas paratiroides, en los estadios iniciales de la uremia. Sin embargo, sugiere también que la regulación alterada de Ca^{2+}_i puede contribuir al crecimiento de las células paratiroides, además de la relativa hipersecreción de la PTH en el hiperparatiroidismo. Se ha demostrado, además, que la 1,25 dehidroxivitamina D inhibe la proliferación pero no la hipertrofia y dediferenciación funcional de las células paratiroides reproducidas [Nygren 1988¹⁰⁴]. Se ha reportado un factor mitogénico con capacidad para estimular la replicación de células paratiroides en pacientes con un MEN I [Brandi 1986¹¹⁹].

I.26.- EPIDEMIOLOGÍA DEL HIPERPARATIROIDISMO**PRIMARIO**

Muy pocos estudios en autopsia han evaluado específicamente la prevalencia de la enfermedad paratiroidea, siendo difícil la interpretación de los resultados dada la ausencia de criterios histológicos que permitan distinguir las glándulas paratiroides patológicas y hacer estricta separación de anormalidades secundarias a una enfermedad renal. En estudios de autopsia realizados por Akerström¹²⁰ (1986), en 422 pacientes, encuentra adenomas en el 2.4% e hiperplasia (determinada por características de peso e histopatológicas) en un 7%. Se disponía de cuantificación de calcio serico "ante mortem" en un tercio de los casos y mostraban hipercalcemia en aquellos pacientes con un adenoma o hiperplasia que exhibían grandes nódulos. Esta nodularidad del tejido paratiroideo fue interpretada como un signo precoz de anormalidad. La hiperplasia y los adenomas se encontraron principalmente en individuos de edad avanzada y en aquellos con nefroesclerosis leve o moderada. Los cambios histológicos fueron igualmente comunes en ambos sexos, resultado que aparentemente contrasta con la predominancia femenina en los estudios clínicos [Cruz-Vigo 1991¹²¹ y Castillo 1991¹²²].

Puede argüirse que los varones resisten mejor la acción calcémica de la PTH, mientras que la deficiencia de estrógeno después de la menopausia aumenta la sensibilidad ósea a la PTH [Joborn 1991¹²³].

En investigaciones realizadas por Christensson¹²⁴ (1976) y Palmér¹²⁵ (1988) a nivel de la población, encontraron que los valores del Ca sérico se encontraban elevados en algo más del 1% de la población femenina postmenopáusica. La prevalencia del hiperparatiroidismo (HPT) diagnosticado

parece ser menor en los hombres y parece aumentar con la edad en ambos sexos [Rapado 1991¹²⁶]. Juntamente con los datos obtenidos por Akerström¹²⁰ (1986) se halla fuerte evidencia de que el hiperparatiroidismo primario (HPTp) es un padecimiento común en la edad avanzada.

Estudios más detallados realizados por Heath¹²⁷ (1980) y efectuados en medio hospitalario, sobre la incidencia del HPT fueron los obtenidos en el condado de Olmsted "USA" (incluyendo la clínica Mayo), proveen una estimación intermedia entre una población no seleccionada y estudios clínicos controlados. La incidencia anual del HPT después de la inclusión de la medición del Ca sérico fue de aproximadamente 27 diagnósticos nuevos por cada 100 000 adultos. La incidencia era aproximadamente el doble en las mujeres que en los hombres y aumentaba a medida que avanzaba la edad en ambos sexos, esta tasa de aumento es probablemente subestimada puesto que no a todas las personas ni siquiera a todos los pacientes se les media anualmente el Ca sérico. No obstante la incidencia es semejante en un estudio realizado por Stenström¹²⁸ (1974) en el norte de Suecia.

En una comunicación hecha por Palmér¹²⁵ (1988), se calcula que únicamente el 10% de todos los pacientes con HPTp se someten a intervención paratiroidea.

Si la información de la Clínica Mayo es considerada como válida para todos los Estados Unidos de Norte América, ello significa que solamente un décimo de todos los pacientes con HPT son diagnosticados [Melton 1991¹²⁹]. Por consiguiente la evidencia disponible indica que el HPTp es un padecimiento común y que los diagnósticos hechos por los clínicos en los últimos años denotan una mayor conciencia de esta situación, pero la mayoría de los casos siguen sin ser diagnosticados.

I.27.- DIAGNÓSTICO DEL HIPERPARATIROIDISMO

El diagnóstico preoperatorio del HPTp requiere la demostración de la secreción anormal de la PTH. Puesto que la característica más precozmente reconocida es el aumento del Ca sérico, provocado por acciones renales u óseas de la hormona, es más práctico diagnosticar el HPT en una doble fase. Primero, documentar la hipercalcemia y, a continuación evaluar las diferentes causas que proveen el aumento del Ca sérico [Ljunghall 1991¹³⁰].

La hipercalcemia se considera, generalmente, como el prerrequisito para el tratamiento quirúrgico del HPTp. Puesto que los resultados de las autopsias realizadas por Akerström¹²⁰ (1986) indican que existe un desarrollo gradual de las formas leves de HPT, cierto número de casos quedan enmascarados dentro de la escala normal del Ca sérico. Se ha establecido igualmente, sin lugar a duda, mediante otros estudios clínicos realizados por Yendt¹³¹ (1968) y Benson¹³² (1987), que tales casos existen aún cuando no se han comprobado claramente los llamados HPT normocalcémicos.

Un análisis matemático realizado por Groth¹³³ (1983), ha demostrado una distribución muy cercana a la meseta de los valores de Ca sérico en el HPT, sin embargo, en este estudio había una evidente falta de valores bajos, sustanciando así que pocos pacientes serían sometidos a cirugía paratiroidea sin una evidente hipercalcemia. Ampliando este análisis teórico, podría anticiparse que aproximadamente el 25% de los pacientes con HPT tendrían valores de Ca sérico incluidos en la mitad superior de la escala normal.

Se emplean varias formulas para ajustar el valor total del Ca sérico respecto a las proteínas plasmáticas, principalmente la albúmina [Ljunghall 1975¹³⁴, Benson 1987¹³², Ladenson 1991¹³⁵].

INTRODUCCIÓN

Es necesario analizar la concentración de PTH en el suero para diagnosticar el HPT como causa de la hipercalcemia. La medición de las concentraciones circulantes de la hormona ha sido notoriamente difícil, puesto que la hormona se degrada rápidamente en la circulación en fragmentos inactivos que dependen de la función renal para su eliminación.

La determinación de la molécula intacta de la PTH, ha tenido consecuentemente un impacto considerable para el diagnóstico diferencial de sujetos con hipercalcemia [Nussbaum 1987¹³⁶]. Los ensayos inmunométricos para la molécula intacta de la PTH tienen varias ventajas sobre los radioinmunoensayos convencionales, incluyendo mayor especificidad, alta sensibilidad y precisión; estando libres de todo efecto sérico no específico. Estas propiedades aumentan las posibilidades de reducir el tiempo de incubación, ampliar la estabilidad de detección y facilitar la realización [Nussbaum 1991¹³⁷]. La medición de la molécula intacta de la PTH, generalmente separa inequívocamente a los pacientes con HPT hipercalcémico de los que tienen otro tipo de hipercalcemia. Sin embargo, todavía se superponen los valores basales entre las formas leves de HPT y la porción superior de la escala normal, alrededor del 20% de todos los pacientes con HPT leve caen en esta categoría [Nussbaum 1991¹³⁷ y Ljunghall 1991¹³⁸].

Puesto que existen correlaciones positivas entre el peso de las glándulas paratiroides, el Ca sérico y las concentraciones de la PTH en el HPT [Benson 1987¹³², Rutledge 1985¹³⁹ y Wallfelt 1990¹⁴⁰], los valores de la PTH tienden a ser inferiores en aquellos pacientes cuya hipercalcemia es menos pronunciada y las glándulas más pequeñas. En estas condiciones, incluso la determinación de la molécula intacta de la PTH no permite la identificación precisa de todos los

pacientes con HPTp. Broadus¹⁴¹ (1980) publicó que las pruebas de supresión mediante la administración de Ca aumentan el grado de precisión diagnóstica en las situaciones dudosas, pero muchos de estos casos no son diagnosticados en la actualidad.

Afortunadamente, casi nunca es necesario apresurar el diagnóstico en estas formas leves sospechosas de HPT y es generalmente posible llegar a una decisión correcta en pocos meses con mediciones repetidas de Ca y PTH.

El diagnóstico diferencial más importante de la hipercalcemia es la discriminación de tumores malignos. La hipercalcemia humoral es provocada por péptidos que tienen un amino-terminal en suficiente homología con la PTH para ligarse a sus receptores y ejercer acciones hipercalcémicas [Gálvez 1995¹⁴²]. A pesar de la semejanza estructural, no existe reacción cruzada en los ensayos de la PTH entre estos factores humorales y la molécula intacta de la PTH.

I.28.- PRESENTACIÓN CLÍNICA Y SINTOMATOLOGÍA

a). SÍNTOMAS ÓSEOS

El HPTp, en su forma clásica, presenta evidentes manifestaciones radiológicas esqueléticas, la más específica de las cuales es la erosión subperióstica que ocurre en sitios típicos, tales como la cara radial de la segunda y tercera falanges y las clavículas distales y, en casos raros y graves, con formaciones quísticas. De ahí la denominación de "osteítis fibrosa quística" [Parisien 1990¹⁴³]. Hoy en día se observan cambios radiográficos del sistema óseo en menos del 20% de los pacientes con HPT [Palmér 1987¹⁴⁴ y Parisien 1990¹⁴⁵].

La cantidad de hueso afectado en el HPT se relaciona con el incremento de la remodelación ósea [Silverberg 1989¹⁴⁶ y Eriksen 1986¹⁴⁷]. Se reconocía anteriormente que la acción catabólica de la PTH podría provocar la dismineralización generalizada en la osteoporosis difusa. Los estudios realizados por Parisien¹⁴⁵ en 1990, indican que existe un efecto preferencial de la PTH sobre el hueso cortical, con preservación del hueso trabecular. Silverberg¹⁴⁶ (1989), Larsson¹⁴⁸ (1989) y Martin¹⁴⁹ (1990), mediante el uso de técnicas modernas para la evaluación de la masa ósea, determinaron que existe un déficit de hueso cortical y una preservación o aumento de los elementos del hueso esponjoso en pacientes con HPT leve. La pérdida ósea en el HPTp parece ser mayor en las etapas iniciales de la enfermedad [Roa 1988¹⁵⁰]. Como resultado de una intervención paratiroidea con éxito, se obtiene una mejoría, aunque no completa, en la recuperación de la masa ósea [Silverberg 1989¹⁴⁶, Martin 1990¹⁴⁹, Mautalen 1986¹⁵¹ y Block 1989¹⁵²].

Larsson¹⁴⁸ (1989) y Peacock¹⁵³ (1984) refieren que existe un riesgo de fracturas del antebrazo en el HPT. Wilson¹⁵⁴ (1988) observó un aumento en la frecuencia de fracturas vertebrales y del cuello femoral en los pacientes con HPT, dicha frecuencia no se ha comprobado en otras series [Castillo 1991¹²², Rápido 1991¹²⁶ y Cruz-Vigo 1991¹²¹]. Hasta la fecha no se han realizado estudios con la suficiente fiabilidad, en cuanto a número de pacientes o duración del seguimiento, para comprobar las tasas de fracturas en pacientes con PTH leve o asintomático, comparadas con individuos sanos y, por consiguiente, no se sabe si la pérdida de masa ósea en el HPT provoca que estos pacientes sean más proclives a las fracturas debido a un mayor grado de fragilidad ósea.

b). SÍNTOMAS RENALES

La consecuencia más importante del HPT sobre la estructura y función renal es la nefrolitiasis y, más raramente, la nefrocalcinosis [Ljunghall 1991¹⁵⁵]. Esta última, por definición, consiste en una precipitación difusa de sales de Ca dentro del parénquima renal. Se halla con frecuencia asociada a una insuficiencia renal grave tanto en filtración, como en funciones tubulares [Backman 1980¹⁵⁶ y Backman 1981¹⁵⁷].

Menos del 50% de los pacientes con HPT, tienen hoy en día cálculos del conducto urinario [Heath 1980¹²⁷, Lafferty 1991¹⁵⁸, Parisien 1990¹⁴⁵ y Silverberg 1990¹⁵⁹]. La formación de cálculos de Ca en el HPT puede ser atribuida a hipercalcemia [Broadus 1980¹⁶⁰ y Ljunghall 1981¹⁶¹], y es menos frecuente en mujeres. En el HPT se produce también un aumento en la excreción de sustancias que favorecen la formación de cálculos y que facilitan la precipitación de sales de Ca [Pac 1979¹⁶²]. No se ha establecido definitivamente disminución

en la excreción de diversos inhibidores endógenos de la formación de cálculos, que podrían estar involucrados en el HPT.

La formación de cálculos renales cesa después de una intervención paratiroidea con éxito. La formación de cálculos recurrentes renales constituye una indicación definitiva para la intervención quirúrgica, aún en aquellos pacientes levemente hipercalcémicos.

Un problema de importancia en este aspecto es la apropiada identificación y el tratamiento adecuado de los pacientes con cálculos renales recidivantes y probable normocalcemia en el HPT [Benson 1986¹⁶³]. Aún cuando la cirugía paratiroidea podría aportar la curación definitiva, la intervención es mucho más difícil de realizar en estos pacientes que tienden a presentar solamente un ligero aumento con frecuencia difuso, de las glándulas paratiroides [Ljunghall 1988¹⁶⁴ y Akerström 1986¹²⁰].

c). SÍNTOMAS NEUROMUSCULARES

Desde hace ya tiempo se han asociado una variedad de síntomas neuromusculares y del comportamiento al HPT.

Joborn (1988¹⁶⁵ y 1989¹⁶⁶) realizó estudios en pacientes con HPTp, que fueron sometidos a un interrogatorio sistemático y detallado; se demostró una amplia sintomatología psiquiátrica, principalmente de carácter depresivo y letárgico. La mayoría de estos pacientes eran claramente asintomáticos y presentaban valores de Ca ligeramente elevado. La gravedad de los síntomas psiquiátricos no se relacionaba linealmente con grado de hipercalcemia, y aún pacientes con HPT leve exhibían trastornos psiquiátricos considerables, que generalmente cedían después de un año de seguimiento posterior a la cirugía

paratiroidea resolutive. Los pacientes con HPT tenían niveles reducidos de metabolitos monoamínicos en el líquido cefalorraquídeo y los estudios realizados por Joborn¹⁶⁷ (1988) sugieren que el exceso de PTH había aumentado la permeabilidad de la barrera hematoencefálica.

En otras publicaciones, Joborn (1988¹⁶⁷ y 1989¹⁶⁸) refiere que los pacientes con HPTp también presentan una fuerza muscular reducida y un defecto de contracción conprobable, que justifican en su estado de cansancio general.

Aparte de sustanciar la constante prevalencia de trastornos psiconeuromusculares en el HPTp, estos resultados subrayan el hecho de que los pacientes no deberían ser clasificados como "asintomáticos", a menos que se hallan tomado las debidas precauciones para excluir estos síntomas menos obvios [Joborn 1986¹⁶⁹].

Aunque se reconoce generalmente que existe una interrelación entre el HPT y los síntomas neuropsiquiátricos [Turken 1989¹⁷⁰], no todos los autores han sido capaces de demostrar mejoría postoperatoria [Brown 1987]. Estos resultados contrastan con los resultados publicados por Joborn¹⁷¹ ([1985), dado que el autor refiere que mejoran sus pacientes ancianos que padecían demencia presenil después de una cirugía paratiroidea con éxito.

d). ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y FACTORES DE RIESGO

Los pacientes con HPTp tienden a tener la tensión arterial elevada [Lafferty 1981¹⁷², Palmér 1987¹⁷³ y Lind 1988¹⁷⁴], niveles altos de triglicéridos séricos [Ljunghall 1978¹⁷⁵], una tolerancia a la glucosa alterada [Ljunghall 1983¹⁷⁶], así como altos niveles de urea sérica [Ljunghall 1982¹⁷⁷].

En un estudio realalizado por Palmér y cols.¹⁷⁸ (1987), llevaron a cabo el seguimiento, durante 14 años, de pacientes con una hipercalcemia leve no tratada, descubierta en una encuesta de salud, se demostró una significativa reducción de la supervivencia mucho más pronunciada en individuos menores de 70 años.

Hasta la fecha no se ha realizado ningún estudio suficientemente amplio que permita cuantificar definitivamente los efectos de la intervención paratiroidea en estos casos. Los resultados en un estudio realizado por Palmér¹⁷⁸ (1987) en 441 pacientes con HPTp, que fueron seguidos por un período de 8 años, indican que el mayor riesgo inicial de fallecimiento quedaba gradualmente reducido después de una intervención paratiroidea.

e). NEOPLASIAS ASOCIADAS

Cierto número de publicaciones, con frecuencia basadas en un número comparativamente reducido o selectivo de pacientes, han descrito la aparición simultánea de HPT y enfermedades malignas de diferente localización.

En un estudio realizado por Palmér¹⁷⁹ (1988), donde se incluyó a más de 4000 pacientes con HPT, con un seguimiento postoperatorio de hasta 22 años, ocurrieron con mayor frecuencia enfermedades malignas que en la población en general. Se observó un aumento general de riesgo de aproximadamente el 50%. Estos resultados sugieren que el HPT o bien favorece la transformación ulterior en tumores malignos o que el HPT y algunas enfermedades malignas tienen los mismos factores etiológicos.

I.29.- HIPERPARATIROIDISMO SECUNDARIO

El hiperparatiroidismo secundario se caracteriza por un aumento en la secreción de la PTH originado en una hiperplasia de las glándulas paratiroides, debida, a su vez, a una respuesta fisiológica a una situación hipocalcemiante.

Generalmente se debe a una insuficiencia renal crónica en el curso de la cual se produce un marcado descenso en la concentración del Ca extracelular, con lo que aumenta la producción de PTH en un intento compensador, que irá desarrollando una hiperplasia de las glándulas paratiroides.

No debemos olvidar que la hipercalcemia puede aparecer en pacientes urémicos con cierta frecuencia bajo las siguientes circunstancias: tras la reducción de la hiperfosfatemia con el tratamiento con geles fijadores de fosfato, en el curso del tratamiento con Ca o vitamina D, durante el tratamiento con diuréticos tiazídicos, durante la hemodiálisis, tras el trasplante renal y de forma espontánea [Sancho 1991¹⁸⁰].

En los pacientes con hiperparatiroidismo secundario los factores que desarrollan hipocalcemia son: a) la hiperfosfatemia, b) la reducción en la síntesis de 1-25-dihidroxitamina D con la consiguiente disminución en la absorción intestinal de calcio, c) la resistencia a nivel óseo a las acciones de la PTH y d) la alteración del mecanismo de retroalimentación (feed-back) entre la calcemia y la secreción de la PTH y e) la disminución en la degradación de la PTH debido a la insuficiencia renal.

I.30.- NEOPLASIA ENDOCRINA MÚLTIPLE TIPO I

La neoplasia endócrina múltiple tipo I (MEN 1) es un desorden hereditario autosómico dominante, que predispone a la hiperfunción de las glándulas paratiroides (hiperplasia), pituitaria (adenoma) y a la aparición de tumores pancreáticos endócrinos [Wermer 1954¹⁸¹]. Los gastrinomas pueden formar parte del MEN 1, sin embargo ocurren más comúnmente como tumores esporádicos [Stabile 1984¹⁸²].

El gen responsable de la tumorigénesis del MEN 1 ha sido identificado en las regiones 11q13 del cromosoma 11 [Bystron 1968¹⁸³, Larsson 1988⁶⁰, Beckers 1994¹⁸⁴ y Eubanks 1994¹⁸⁵]. Los tumores en el MEN 1 se desarrollan según la teoría de Knudson¹⁸⁶ (1971) a partir de dos mutaciones (two-hit mutation). Estas dos mutaciones implicadas inactivan ambas copias homólogas del gen supresor tumoral. La primera mutación (first hit) puede ser una mutación de la línea germinal hereditaria dominante o una mutación esporádica del mismo tumor. Los tumores se originan de un segundo hecho mutacional (secund hit), que es usualmente una delección cromosómica del gen supresor tumoral. La inactivación del gen supresor tumoral ocurre por mutación de ambos alelos. Un alelo puede tener una pequeña mutación parecida a una delección o a una traslocación, mientras que el otro alelo puede ser inactivado por la pérdida cromosómica en la recombinación mitótica o por delección.

Las pérdidas heterozigóticas (pérdida del alelo) de las regiones cromosómicas específicas 11q13 han sido detectadas por Thakker¹⁸⁷ (1989) y Byström¹⁸⁸ (1990) en lesiones paratiroidea del MEN I y en adenomas esporádicos paratiroideos, sin embargo este evento cromosómico solo ocurre en el 30% de todos los pacientes estudiados y reflejados en la literatura [Eubanks 1994¹⁸⁵].

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

Con la realización de este trabajo pretendemos:

- 1.- Demostrar la presencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos cultivados de sangre periférica de pacientes con enfermedad paratiroidea.
- 2.- Establecer un patrón citogenético en linfocitos cultivados de sangre periférica de los pacientes con enfermedad paratiroidea.
- 3.- Establecer los hallazgos cariotípicos en el tejido paratiroideo de pacientes con adenoma e hiperplasia y comparar dichos hallazgos .
- 4.- Comparar estadísticamente los hallazgos citogenéticos en los linfocitos cultivados de sangre periférica de los pacientes con un grupo control de individuos sanos y voluntarios.
- 5.- Comparar las diferencias cromosómicas entre hiperparatiroidismo primario, secundario y terciario.

III. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

III. PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

Para la realización de esta experiencia, el trabajo se ha planteado de la siguiente manera:

- III.1.– Elección al azar de pacientes sometidos a una cirugía paratiroidea.
- III.2.– La sangre periférica debería ser extraída previamente a la inducción de la anestesia y en condiciones estériles, en los pacientes con hiperparatiroidismo.
- III.3.– El tejido paratiroideo debería ser elegido de la siguiente manera:
En aquellos pacientes con un adenoma, el tejido se tomaría del mismo; en los pacientes con una hiperplasia, se elegiría el tejido de la glándula que sería autotransplantada. Dicho tejido debería ser manipulado en condiciones estériles.
- III.4.– Tanto la muestra de sangre periférica como la del tejido deberían ser inmediatamente transportadas al laboratorio en un recipiente a 4º C.
- III.5.– La manipulación de las muestras en el laboratorio debería realizarse también en condiciones estériles y en campana de flujo laminar.
- III.6.– El grupo control debería estar constituido por individuos sanos voluntarios.
- III.7.– El método de cultivo celular y el método de bandeo deberían ser ajustados e informados según normas internacionales.

*IV. MATERIAL
Y
MÉTODOS*

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

IV.1.- Material

Realizamos un estudio citogenético en 29 pacientes intervenidos por patología paratiroidea en el Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo "A" del Hospital Universitario 12 de Octubre, entre el 20 de Mayo de 1992 y 31 de Mayo de 1995.

Efectuamos el cariotipo de sangre periférica y de tejido paratiroideo; cuando se trata de un adenoma tomamos el tejido de éste y cuando se trata de una hiperplasia lo tomamos de aquella glándula que va a ser autotransplantada.

Hemos realizando un grupo control en 29 voluntarios sanos, a los cuales realizamos el cariotipo mediante extracción de sangre periférica.

IV.1.1.- Componentes para procesar las muestras

a). Material para el cultivo

MEDIO: (Contienen sales minerales, aminoácidos, precursores de ADN y fracciones proteicas)

– RPMI 1640

– HAMS F10

SUERO: Suero de ternera fetal, se utiliza para enriquecer el medio de cultivo.

FITHEMAGLUTININA: Sólo se añade a los cultivos de sangre periférica. Añadimos al cultivo un agente mitogénico (que induce la mitosis); el más empleado es la fitohemaglutinina. Su función, como hemos dicho anteriormente, es aumentar el número de mitosis, con lo cual la probabilidad de encontrar metafases es mayor.

HEPES: Tampón para evitar oscilaciones del pH, debidas al metabolismo celular.

ANTIBIÓTICOS: Penicilina / Estreptomicina, para evitar posibles contaminaciones.

L-GLUTAMINA: Aminoácido para enriquecer el medio.

b). Material para la técnica

COLCHICINA : Los cromosomas se observan mejor en el estudio de la metafase, por lo que no basta con mantener las células en multiplicación activa, sino que es importante detener la división en esta etapa que nos interesa. Este hecho se logra utilizando colchicina, ya que la función de esta sustancia es impedir la formación del huso acromático y, por tanto, el proceso de mitosis no puede seguir adelante.

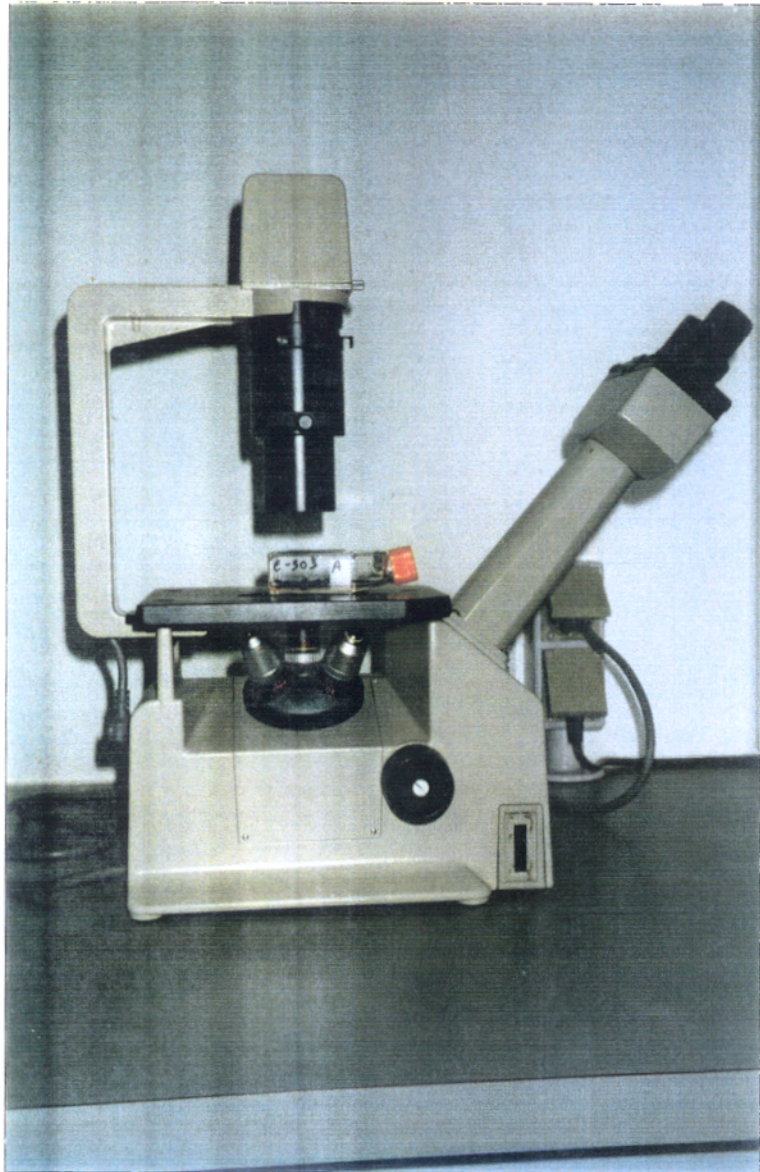
CLK: Solución hipotónica para dispersar los cromosomas.

El agua tiende a penetrar en la célula, lo cual hace que los cromosomas se dispersen dentro del cuerpo celular y por tanto, la morfología de los mismos sea óptima para su estudio.

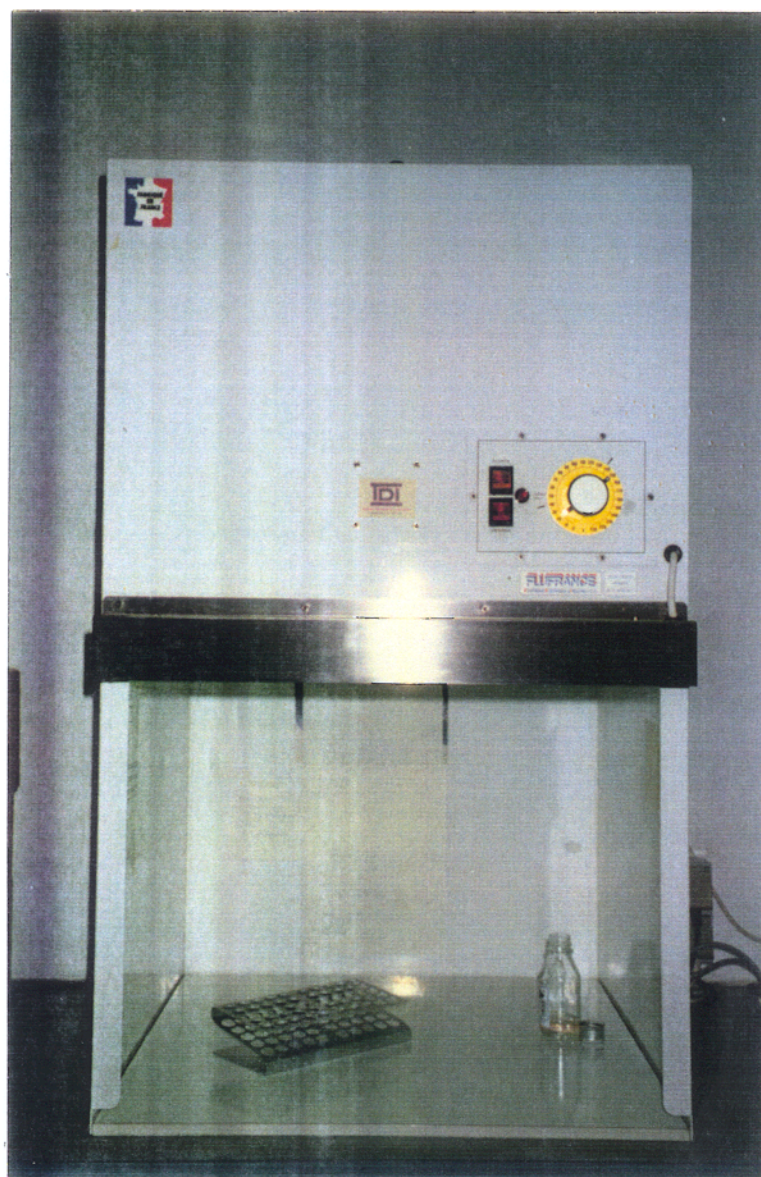
LÍQUIDO CARNOY: La solución de Carnoy es preparada con metanol y ácido acético en una proporción 3:1. Su función es estabilizar y mantener la estructura del cromosoma para que posteriormente pueda ser tratada con otros métodos.

c). Otro material

TUBOS DE HEPARINA LITIO: Tubos con un cierre hermético para que no se contamine la sangre periférica. La heparina litio tiene la finalidad de que la sangre no se coagule.



TUBOS DE CULTIVO FLASK: Tubos especiales para la visualización microscópica del crecimiento celular durante el cultivo.

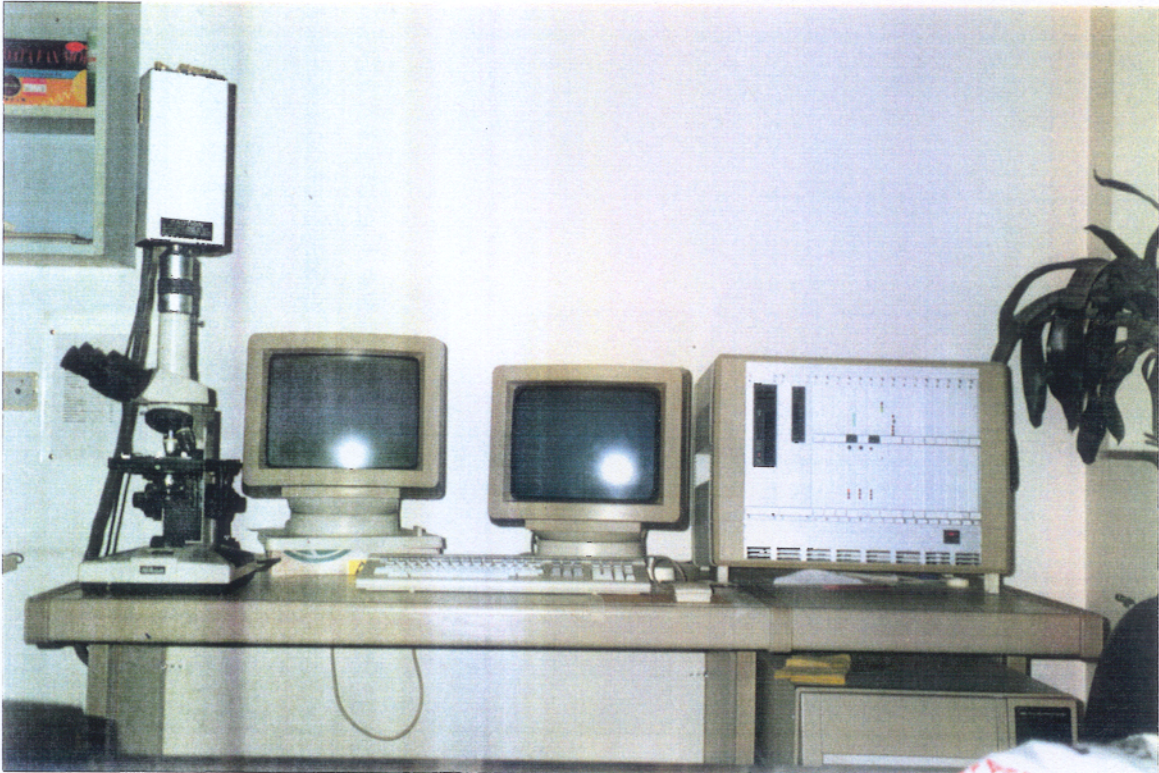


CAMPANA DE FLUJO LAMINAR: Campana de flujo laminar vertical C10 (Miniflux). Toda la manipulación del tejido se realiza en ella y en condiciones estériles.



ESTUFA BACTERIOLOGICA Y DE CULTIVOS: Estufa marca Selecta.

Cuenta con regulación de temperatura por termostato hidráulico, con escala comparativa en grados centígrados.



AUTOANALIZADOR DE IMAGEN: Analizador de imagen Cytoscan
(APPLIED IMAGING) en el cual se realiza el cariotipo

IV.2.- MÉTODO

IV.2.1.- Estudio de la sangre periférica

Se realizó el cultivo de linfocitos de sangre periférica en 29 pacientes con enfermedad paratiroidea y en 29 individuos sanos (grupo control).

Se extrajeron 5 ml. de sangre venosa en condiciones estériles, la sangre fue extraída en quirófano, en los pacientes, y en la consulta de Citogenética, en el grupo control.

La sangre fue recogida en tubos de heparina-litio, siendo esta trasladada al laboratorio en un recipiente con hielo.

En un tubo de plástico estéril con cierre hermético se añaden 5 ml. de medio completo, precalentado a 37°C. A este medio se añaden:

- 5 gotas de la muestra de sangre periférica extraída correspondiente a la capa de linfocitos.
- 0.2 ml. de plasma para enriquecer.
- 0.15 ml. de fitohemaglutinina.

Posteriormente fue incubada y procesada de la siguiente forma:

1ª. Cultivo de 72 horas en RPMI-1640 con el fin de establecer un cariotipo patrón y a la vez descartar anomalías constitucionales.

2ª. Cultivo de sincronización con metotrexate-timidina, para conseguir un cromosoma más bandeado.

3ª-a. Cultivo de 72 horas con etidium-bromide para obtener mejor calidad de los cromosomas.

3º-b. Cultivo de 96 horas en medio F 199. Este es un medio pobre en ácido fólico y nos pone de manifiesto la fragilidad cromosómica.

Los cultivos se pararon con colchicina, cuyo volumen y tiempo varían según el tipo de cultivo y después del choque hipotónico con CLK se fijaron con 4 pases por una solución de metanol/ácido acético según protocolo standard.

Las metafases se analizaron por bandeo G y C.

IV.2.2.- Métodos de bandeo

Después de los tratamientos químicos, se hace la extensión en portas de cristal. Ahora podemos someter estos portas a técnicas de bandas que nos darán patrones característicos para cada cromosoma. Definimos una banda como una zona del cromosoma distinguible claramente de sus zonas adyacentes por la mayor o menor intensidad de su tinción.

IV.2.3.- Técnica de bandas

a). Bandas G

Introducimos el porta en una solución de tripsina (enzima proteolítica), lavamos con agua y teñimos con Giemsa al 3% en un tampón pH = 6.7. El patrón de bandas, cuando lo sometemos a esta técnica es siempre el mismo para cada cromosoma.

b). Bandas C

Tratamiento de los portas con compuestos alcalinos Ba (OH)₂ ó NaOH y soluciones salinas. Teñimos con Giemsa. El patrón de bandas que nos aparece con estos tratamientos corresponde a los centrómeros de cada cromosoma (todas las zonas que contengan heterocromatina).

IV.2.4.– Estudio del tejido paratiroideo

Se estudió el tejido paratiroideo de 29 pacientes (17 Adenomas y 12 Hiperplasias), el tejido fue obtenido en el momento de la intervención y fue seleccionado como anteriormente referimos; su manipulación fue en condiciones esteriles. El tejido se coloca en tubos estériles y cubierto de suero fisiológico, éste evita que el tejido se seque y las células mueran. Los tubos son trasladados al laboratorio en un recipiente con hielo.

Se coloca el tejido paratiroideo en una placa de Petri estéril dentro de la campana de flujo laminar. Se lava bien con suero fisiológico o con medio de lavado para limpiar el tejido y arrastrar restos de sangre. Una vez lavado se selecciona el tejido a sembrar.

Después se pasa el tejido seleccionado para la siembra a otra placa de Petri estéril y se comienza a disgregar mecánicamente la pieza con tijeras estériles. La pieza se disgrega siempre embebida en medio de cultivo o medio de lavado a fin de que no se seque y mueran las células.

Se prepara el medio de cultivo con la siguiente formula:

F-10 HAM.....	100 ml.
L-glutamina.....	1 ml.
Penicilina / Estreptomicina.....	5 – 2 ml.
HEPES.....	1.5 ml.
Suero de ternera fetal.....	10 ml

El tejido paratiroideo se procesó de tres formas diferentes:

a). Técnica directa

Se toma una porción del triturado y se pone en un tubo de cultivo como el de las muestras hemáticas. Se añade 1 ml de medio de cultivo o, en su defecto, de medio de lavado. Añadimos la cantidad suficiente para tener 200 U/ml de colagenasa tipo II. Se deja incubando toda la noche a 37°C en estufa. A la mañana siguiente, se divide el contenido, de forma que obtenemos:

CULTIVO NORMAL: Se pasa parte a un tubo Flask^R de cultivo y se le añade medio de cultivo. Será un cultivo donde tendremos menos peligro de que crezcan fibroblastos.

TÉCNICA DIRECTA: Se le añade colchicina al tubo y se mantiene en estufa una hora y treinta minutos para después seguir con el protocolo de explantes de sacrificio que a continuación referimos.

Se sacrifican los cultivos cuando hemos visto la proporción entre la cantidad de células adheridas al fondo del tubo de cultivos y la cantidad de células en división celular.

Si se tienen muchos fibroblastos y pocas colonias celulares, es preferible tripsinizar y deshechar o tripsinizar y subcultivar, independientemente de si se han hecho ya subcultivos o no. Si se tienen pocos fibroblastos y muchas colonias celulares, es mejor no manipularlo, porque las colonias celulares solas se pierden al hacer la técnica. Cuando nos encontramos colonias celulares dobles, esto indica que ya se ha pasado la metafase y que estamos en anafase.

MATERIAL Y MÉTODO

Para sacrificar, primero se añaden 0.03 ml de colchicina a los cultivos y se incuban una hora y treinta minutos a 37°C en la estufa. Pasado ese tiempo se decanta el medio en un tubo de centrífugado debidamente rotulado. Se añade 1 ml. de tripsina-EDTA precalentado a 37°C y se vierte también en el tubo de centrífugado. Se añade 1 ml. de tripsina-EDTA de nuevo y se deja que asciendan las células. Se comprueba al microscopio invertido si se han levantado las células y se resuspende el sobrenadante con una pipeta Pasteur estéril antes de recogerla y ponerla en el tubo de centrífugado.

Con el tubo que hemos sacrificado podemos hacer dos cosas:

1º. Añadirle medio de cultivo: para que sigan creciendo las células que hayan quedado y tener un tubo de cultivo más.

2º. Deshecharlo.

Una vez sacrificado el cultivo, se centrifugan las muestras a 1300 rpm durante 10 minutos. Se deja en 1 ml., se resuspende y se añaden hasta 5 ml de CLK previamente calentado a 37°C. Se mantienen en baño a 37°C durante 28-30 minutos.

Se centrifuga, se deja en 0.5 ml. y se resuspende.

Se añade el primer fijador (vortex^R) y se resuspende.

Se centrifuga, se deja en 1 ml. y se resuspende.

Se añaden otros dos fijadores.

Finalmente, se centrifuga y se deja en 0.5 – 1 ml según el sedimento.

Se hacen dos extensiones por tubo con 4 o 5 gotas.

b). Cultivo en explante

Se recoge la semi-papilla obtenida con una pipeta Pasteur estéril y se reparte por la superficie de un tubo Flask^R de cultivo. Normalmente, el poco medio que hemos utilizado para la disgregación debe ser suficiente para recoger y sembrar la muestra. De no ser así, se puede poner otra pequeña cantidad de medio en la placa de Petri, que nos permita recoger la muestra. Ésta debe estar siempre húmeda pero con muy poco medio para que la adherencia del tejido y/o células a la superficie de cultivo sea rápida y correcta, ya que de esto depende el crecimiento celular.

Normalmente se trabaja con dos medios de cultivo de dos casas comerciales distintas a fin de discernir entre alteraciones de cultivo, mosaicos y verdaderas alteraciones del cariotipo.

Se suelen sembrar dos tubos (A y B), cada uno con un medio de cultivo distinto.

A continuación se ponen a incubar en estufa a 37°C. A las 48 horas de haber iniciado el cultivo se les añade una pipeta Pasteur de medio de cultivo, a cada tubo de un medio distinto. El medio de cultivo, al añadirlo al tubo se deja deslizar por la pared del mismo en la que no está asentado el explante, para que no se despegue. A continuación se observa en el microscopio su evolución y se pone en la estufa a incubar 4 ó 5 días antes de volver a mirarlos.

A partir de este momento, hay que vigilar los cultivos a diario. Cuando crecen se puede hacer lo siguiente:

TRIPSINIZAR Y SUBCULTIVAR:

Esto se hace cuando el crecimiento del cultivo es bueno. Su finalidad es tener más tubos para que el momento del sacrificio llegue antes.

Se decanta el medio de cultivo, se le añade 1 ml de solución especial para líquidos amnióticos y 1.5 ml de solución para tumores y explantes que se hayan sembrado en el tubo Flask^R de tripsina-EDTA precalentada a 37°C, se decanta la tripsina, se vuelve a añadir 1 ml de tripsina-EDTA y se deja que las células se levanten. Se observa al microscopio invertido si se han levantado.

Una vez levantadas las células, se resuspende el sobrenadante y se reparte el mismo en dos tubos rotulados: el original y el subcultivo. Se les añade medio de cultivo a ambos y se guardan en la estufa. Al día siguiente hay que ponerles medio fresco.

TRIPSINIZAR Y DESHECHAR:

Es el mismo proceso que el anterior, sólo que en vez de subcultivar, parte del sobrenadante con las células levantadas se tira. Esto se hace cuando la muestra ha crecido demasiado y no se ven aglomerados de división celular.

Su finalidad es la de tener menos fibroblastos para que vuelvan a dividirse. Cuando de la muestra crecen fibroblastos y tienen pocas aglomerados de división celular es preferible tirar que sacrificar el cultivo por esos pocos aglomerados.

TRIPSINIZAR Y PASAR:

Se realiza cuando el cultivo es viejo y aún se necesita contar alguna metafase más o cuando el aspecto del cultivo no es bueno.

Las células se levantan con tripsina-EDTA precalentada a 37°C; se comprueba que se han levantado, se resuspende el sobrenadante y se pasa a otro tubo de cultivo, bien todo o bien una parte. A continuación se le añade 5 ml. de medio de cultivo y se guardan en la estufa. Al día siguiente se les cambia de medio.

CAMBIAR EL MEDIO:

Sin resuspender se tira el sobrenadante por la cara libre de cultivo. Se añade una pipeta pequeña a los tubos Falcon^R (L.A.) y a los tubos Flask^R (E. y T.), dejando resbalar el medio por las paredes libres de cultivo.

c). Cultivo de células en suspensión tras digestión con colagenasa II

Se utilizan 25 mg de colagenasa tipo II liofilizada, añadiendo 4 ml de agua destilada. La actividad de la colagenasa tipo II es habitualmente: 440 U./mg. sólido.

La proporción utilizada es: para un ml de medio de cultivo enriquecido o sin enriquecer, 200 U. de colagenasa.

V.2.5.– Método de tinción

– 15 seg. en sales 2 X SSC. lavar y secar.

– De 5 – 10 seg. en la solución de Tripsina . Lavar y secar.

– 45 seg.: – 3 ml de buffer:

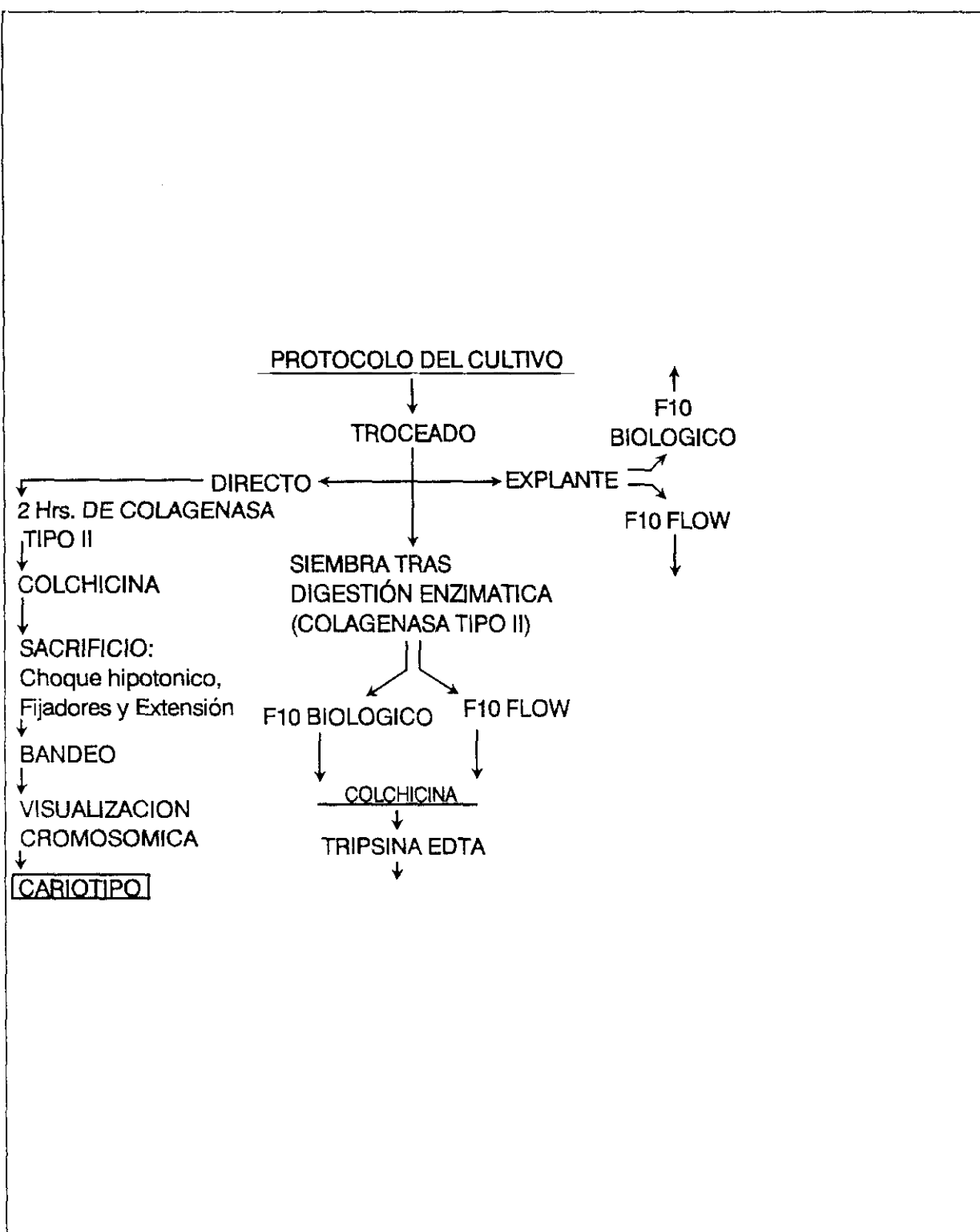
– 1/2 Sorensen (1.5 ml.)

– 1/2 Botella (1.5 ml.)

– y 1 ml de Wright. Lavar y secar.

– A veces se utiliza 1 min. en 2 X SSc, 1 seg. en solución de tripsina y 30 seg. en colorante (Wright + buffer; 1:3).

Los tiempos pueden variar, dependiendo de la calidad del colorante, del tiempo que lleve preparado.



IV.3.- Análisis estadístico

Con la cooperación del Departamento de *Estadística e Investigación Clínica* del Hospital Universitario "12 de Octubre" se realizó un análisis estadístico con los programas; Dbase IV y SAS.

Se utilizó un ordenador personal Toshiba (T2100) para la redacción del trabajo.

IV.4.- Pacientes

Desde el 20 de Mayo de 1992 hasta el 31 de Mayo de 1995 se han intervenido 29 pacientes con enfermedad paratiroidea para ser incluidos en este estudio. La distribución por sexos fue de 21 mujeres (72.4%) y 8 varones (27.4%). La media de edad se situó en 51.5 años, teniendo el paciente más joven 24 años y 72 años el de mayor edad. El grupo de pacientes fue elegido al azar y se compone de 18 (62.1%) pacientes con hiperparatiroidismo primario (17=adenomas y 1=hiperplasia), 7 (24.1%) pacientes con hiperparatiroidismo secundario, 3 (10.3%) pacientes con hiperparatiroidismo terciario y un paciente (3.4%) con un MEN I (hiperplasia).

A los pacientes portadores de adenoma único se les practicó la exéresis del adenoma y biopsia de un fragmento de una glándula aparentemente sana, confirmándose el diagnóstico.

A los pacientes con hiperplasia se les realizó una paratiroidectomía total con autotransplante en el antebrazo en el transcurso del mismo acto operatorio, y simultáneamente se procedió a la crioconservación del tejido paratiroideo.

Presentamos a continuación cada caso clínico según el protocolo realizado para la recolección de datos.

PACIENTE n° 1

Sexo: Mujer	Edad: 66 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Hipertensión arterial	

Parámetros pre y postoperatorios de la molécula intacta de la PTH, del Ca plasmático y de las proteínas.

	PTHmi	CALCIO	PROTEINAS T.
Preoperatorio	300 pg/ml	11.5 mg/dl	6.7 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	36.1		
A las 24 Hrs. del P.O.	18	7.6	6.1
Al alta	19.7	8.9	6.9
A los 36 meses de la Cirugía	22	9.7	7.7

PACIENTE nº2

Sexo: Varon	Edad: 55 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	--------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u> 1.- Dolor osteoarticular	<u>SIGNOS</u> 1.- Osteoporosis radiológica
---	--

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	1000 pg/ml	10.3 mg/dl	7.0 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	6.5	6.8
Al alta	No detectable	8.4	6.8
A los 37 meses de la Cirugía	50	10.2	7.1

PACIENTE nº 3

Sexo: Mujer	Edad: 55 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Dolor osteoarticular	2.- Osteoporosis
3.- Hipertensión arterial	

Parametros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	150.4 pg/ml	10.8 mg/dl	7.6 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	6.7		
A las 24 Hrs. del P.O.	15.8	7.0	6.4
Al alta	5.6 p	8.5	7.1
A los 31 meses de la Cirugía	34.6	10.5	9.0

PACIENTE nº 4

Sexo: Mujer	Edad: 39 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	200 pg/ml	11.3 mg/dl	6.7 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	23		
A las 24 Hrs. del P.O.	21.8	7.8	6.1
Al alta	20.8	7.9	5.6
A los 20 meses de la Cirugía	18.5	8.8	6.9

PACIENTE nº 5

Sexo: Mujer	Edad: 59 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	-----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular	1.- Osteoporosis
2.- Deformidad ósea	
3.- Hipertensión arterial	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	308.9 pg/ml	10.9 mg/dl	6.8 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	9.2	6.6
Al alta	No detectable	8.7	6.9
A los 17 meses de la Cirugía	17.5	8.4	7.5

PACIENTE nº 6

Sexo: Mujer	Edad: 65 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	-----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular	1.- Osteoporosis
2.- Deformidad ósea	
3.- Hipertensión arterial	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	1533 pg/ml	11.7 mg/dl	7.3 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	9.8	7.1
Al alta	No detectable	9.6	7.0
A los 24 meses de la Cirugía	27.7	9.7	6.4

PACIENTE nº 7

Sexo: Mujer	Edad: 36 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

HIPERCALCEMIA ASINTOMÁTICA

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	107 pg/ml	11.1 mg/dl	7.4 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	13.7		
A las 24 Hrs. del P.O.	8.3	7.4	5.6
Al alta	15.6	8.3	6.0
A los 24 meses de la Cirugía	36.7	8.9	7.1

PACIENTE nº 8

Sexo: Mujer	Edad: 44 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u> 1.- Dolor osteoarticular 2.- Hipertensión arterial	<u>SIGNOS</u> 1.- Osteoporosis
---	--

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	580 pg/ml	11.4 mg/dl	7.4 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	55.0		
A las 24 Hrs. del P.O.	26.0	10.3	7.1
Al alta	24.9	10.1	7.0
A los 17 meses de la Cirugía	21.0	10.2	7.2

PACIENTE n° 9

Sexo: Mujer	Edad: 24 años	Diagnóstico: HPT terciario
-------------	---------------	----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular 2.- Hipertensión arterial	1.- Osteoporosis

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	368 pg/ml	14.7 mg/dl	6.8 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	7.9	7.6
Al alta	No detectable	8.9	7.1
A los 27 meses de la Cirugía	20.6	9.4	6.9

PACIENTE nº 10

Sexo: Varón	Edad: 50 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Dolor osteoarticular	2.- Ulcus duodenal
3.- Dispepsia	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	400 pg/ml	11.5 mg/dl	7.0 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	11		
A las 24 Hrs. del P.O.	8.9	6.6	5.9
Al alta	9.9	8.6	6.4
A los 11 meses de la Cirugía	15	8.7	6.3

PACIENTE nº 11

Sexo: Varón	Edad: 49 años	Diagnóstico: HPT terciario
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular 2.- Hipertensión arterial	1.- Osteoporosis

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	765.2 pg/ml	11.5 mg/dl	6.9 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	7.2	7.1
Al alta	No detectable	8.9	7.2
A los 19 meses de la Cirugía	35.9	9.3	6.9

PACIENTE nº 12

Sexo: Mujer	Edad: 63 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	-----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Poliuria	2.- Nefrocalcinosis
3.- Dolor osteoarticular	3.- Osteoporosis
4.- Hipertensión arterial	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	908 pg/ml	11.2 mg/dl	7.3 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	10.4	6.2
Al alta	No detectable	9.9	7.1
A los 12 meses de la Cirugía	11.4	10.5	7.0

PACIENTE nº 13

Sexo: Mujer	Edad: 68 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Dolor osteoarticular	2.- Osteoporosis
3.- Deformidad ósea	3.- Ulcus duodenal
4.- Hemorragia digestiva alta	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	927 pg/ml	11.9 mg/dl	7.3 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	76.5		
A las 24 Hrs. del P.O.	15.7	6.2	5.7
Al alta	132	8.4	7.9
A los 14 meses de la Cirugía	162	9.3	7.4

PACIENTE n° 14

Sexo: Mujer	Edad: 61 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Hipertensión arterial	
3.- Abortos	
4.- Síndrome depresivo	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	253 pg/ml	12 mg/dl	7.1 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	22		
A las 24 Hrs. del P.O.	16.2	7.2	6.5
Al alta	12.2	8.5	6.6
A los 10 meses de la Cirugía	13.5	8.4	7.0

PACIENTE nº 15

Sexo: Mujer	Edad: 42 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma, Carcinoma de mama y Colelitiasis
-------------	---------------	---

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Poliuria 2.- Síndrome depresivo	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:.

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	122.7 pg/ml	11.1 mg/dl	7.4 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	14.9		
A las 24 Hrs. del P.O.	15.1	5.6	5.8
Al alta	33.7	8.2	6.0
A los 8 meses de la Cirugía	78.4	9.4	7.5

PACIENTE nº 16

Sexo: Varón	Edad: 68 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1. Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renoureteral
2.- Hipertensión arterial	2.- Ulcus péptico
	3.- Pancreatitis recidivante

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	Calcio	Proteína T.
Preoperatorio	109 pg/ml	12.3 mg/dl	7.0 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	45		
A las 24 Hrs. del P.O.	33	8.3	7.1
Al alta	15.8	8.1	6.9
A los 12 meses de la Cirugía	32	8.1	7.0

PACIENTE nº 17

Sexo: Mujer	Edad: 28 años	Diagnóstico: HPT familiar por MEN 1
-------------	---------------	--

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Hipertensión arterial	2.- Adenoma hipofisiario
3.- Hirsutismo	
4.- Galactorrea	
5.- Acne	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	Calcio	Proteínas T.
Preoperatorio	151.2 pg/ml	11.3 mg/dl	7.3 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	7.8	6.0
Al alta	No detectable	8.2	7.4
A los 6 meses de la Cirugía	32.4	8.8	7.5

PACIENTE nº 18

Sexo: Mujer	Edad: 45 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renoureteral
2.- Poliuria	2.- Ulcus duodenal
3.- Dolor osteoarticular	
4.- Dispepsia	
5.- Polidipsia	

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	136.1 pg/ml	12.6 mg/dl	6.4 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	42		
A las 24 Hrs. del P.O.	50	8.1	5.4
Al alta	65	9.3	5.2
A los 8 meses de la Cirugía	22	9.7	7.2

PACIENTE nº 19

Sexo: Mujer	Edad: 37 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	-----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular 2.- Hipertensión arterial	1.- Osteoporosis

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	750 pg/ml	11.5 mg/dl	9 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	7.2	7.1
Al alta	No detectable	8.5	6.5
A los 17 meses de la Cirugía	43.2	8.1	8

PACIENTE nº 20

Sexo: Mujer	Edad: 72 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renoureteral
2.- Dolor osteoarticular	2.- Nefrocalcinosis
3.- Hipertensión arterial	3.- Condrocalcinosis

Parámetros analíticos pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	74.9 pg/ml	11.0 mg/dl	7.5 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	10		
A las 24 Hrs. del P.O.	13	8.2	6.1
Al alta	16	8.6	6.3
A los 5 meses de la Cirugía	24.8	9.4	6.7

PACIENTE nº 21

Sexo: Mujer	Edad: 50 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

HIPERCALCEMIA ASINTOMÁTICA

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	392 pg/ml	11.5mg/dl	6.9 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	50		
A las 24 Hrs. del P.O.	33	6.9	6.1
Al alta	41	9.0	6.6
A los 7 meses de la Cirugía	44.8	8.5	6.9

PACIENTE nº 22

Sexo: Varón	Edad: 43 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

HIPERCALCEMIA
ASINTOMÁTICA

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	200 pg/ml	11.0 mg/dl	6.9 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	40		
A las 24 Hrs. del P.O.	39	7.0	6.2
Al alta	34	8.2	6.2
A los 17 meses de la Cirugía	40	8.5	6.2

PACIENTE n° 23

Sexo: Varón	Edad: 72 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis
2.- Dolor osteoarticular	renoureteral
3.- Hipertensión arterial	

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	72.5 pg/ml	14.2 mg/dl	7.7 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	15.9		
A las 24 Hrs. del P.O.	20.1	8.5	6.6
Al alta	32	9.2	6.3
A los 9 meses de la Cirugía	39.4	9.8	7.4

PACIENTE nº 24

Sexo: Mujer	Edad: 50 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

HIPERCALCEMIA ASINTOMÁTICA

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	139 pg/ml	11.0 mg/dl	7.7 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	23		
A las 24 Hrs. del P.O.	12	8.5	6.6
Al alta	15.9	9.0	6.3
A los 11 meses de la Cirugía	35	9.1	6.1

PACIENTE N° 25

Sexo: Varón	Edad: 51 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	--------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular	1.- Osteoporosis
2.- Necrosis distal de dedos	2.- Calcifilaxis vascular

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	349.5 pg/ml	12 mg/dl	6.6 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	8.4	6
Al alta	No detectable	8.5	5.9
A los 5 meses de la Cirugía	230	8.7	6.7

PACIENTE nº 26

Sexo: Mujer	Edad: 56 años	Diagnóstico: HPTp por adenoma
-------------	---------------	-------------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Cólicos renoureterales	1.- Litiasis renal
2.- Dolor osteoarticular	2.- Osteoporosis
3.- Dispepsia	3.- Pancreatitis aguda

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	201.9 pg/ml	11.6 mg/dl	6.9 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	40.1		
A las 24 Hrs. del P.O.	33.6	8.9	7.0
Al alta	21.1	8.7	7.7
A los 6 meses de la Cirugía	32.1	8.5	7.0

PACIENTE nº 27

Sexo: Varón	Edad:36 años	Diagnóstico: HPT terciario
-------------	--------------	----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular 3.- Hipertensión arterial	1.- Osteoporosis

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	272 pg/ml	11.0 mg/dl	7.5 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	7.1	6.9
Al alta	No detectable	7.6	7.2
A los 12 meses de la Cirugía	15	8.0	7.0

PACIENTE nº 28

Sexo: Mujer	Edad: 54 años	Diagnóstico: HPTp (Hiperplasia) y Bocio multinodular
-------------	---------------	---

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Asintomático	1.- Bocio
2.- Tumoración cervical	

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	399.6 pg/ml	11.8 mg/dl	7.6 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	7.5	7.3
Al alta	No detectable	8.4	7.5
A los 4 meses de la Cirugía	7.9	8.7	8.7

PACIENTE nº 29

Sexo: Mujer	Edad: 58 años	Diagnóstico: HPT secundario
-------------	---------------	-----------------------------

<u>SÍNTOMAS</u>	<u>SIGNOS</u>
1.- Dolor osteoarticular 2.- Hipertensión arterial	1.- Osteoporosis

Parámetros analítico pre y postoperatorios:

	PTHmi	CALCIO	PROTEÍNAS T.
Preoperatorio	300 pg/ml	12 mg/dl	7.6 g/dl
A los 30 min. de la exéresis	No detectable		
A las 24 Hrs. del P.O.	No detectable	10	7.3
Al alta	No detectable	10.1	7.5
A los 12 meses de la Cirugía	11	9.9	8.1

IV.5.- GRUPO CONTROL

Se les propuso a 29 individuos voluntarios sanos la extracción de sangre periférica para la realización de un análisis citogenético, explicándoles el motivo por el cual se les pedía su colaboración.

El grupo control se compuso de 14 mujeres y 15 varones, el más joven tenía 29 años y el de mayor edad 54 años; la edad media fue de 41.2 años.

El material y método utilizados para el análisis cromosómico fue el mismo que en nuestros pacientes, para sangre periférica.

Se propuso analizar 25 metafases de cada individuo control.

—

V. RESULTADOS

V. RESULTADOS

V.1.- Resultados de los métodos de cultivo celular

a). Sangre periférica.

El cultivo de linfocitos de sangre periférica es el método más estandarizado para la realización del cariotipo, permitiendo obtener resultados valorables.

El tiempo del cultivo para el análisis cromosómico fue de 3 días tanto en el grupo control como en los pacientes.

El crecimiento de los linfocitos fue satisfactorio en 27 pacientes (93.1%), en un paciente (caso N° 29) sólo fue posible analizar 7 leucocitos, y en el otro paciente (Caso N° 9) no creció el cultivo de la sangre periférica; esta falta de crecimiento fue considerada como actitud extraña.

El crecimiento de los linfocitos en el grupo control fue satisfactoria en todos ellos.

b). Tejido paratiroideo.

Los tejidos cultivados se observaron diariamente al microscopio y se hizo un registro del comportamiento del mismo, registrando el día de la aparición de los fibroblastos, de los pequeños islotes o colonias celulares y también del fracaso por contaminación o por la falta de crecimiento.

En el tejido paratiroideo, tanto en el adenoma como en la hiperplasia los fibroblastos aparecen a los 6.68 días y se observan colonias celulares a los 7 días después de la aparición de los fibroblastos.

En total, necesitamos una media de 91.9 (Rango 3 – 254) días de cultivo para poder analizar citogenéticamente el tejido paratiroideo.

Comparamos el tiempo de crecimiento del cultivo de explante frente al tratado tras digestión enzimática, y observamos que el cultivo tras la digestión enzimática creció más rápidamente pero no de forma estadísticamente significativa.

A continuación presentamos un esquema de los resultados del cultivo celular de los 10 primeros pacientes.

PACIENTES	Nº DE CÉLULAS ANALIZABLES	DÍAS DE CULTIVO
Caso Nº 1 (HPT primario)	64	46
Caso Nº 2 (HPT secundario)	0	69
Caso Nº 3 (HPT primario)	1	8
Caso Nº 4 (HPT primario)	4	125
Caso Nº 5 (HPT secundario)	CONTAMINACIÓN	3
Caso Nº 6 (HPT secundario)	46	103
Caso Nº 7 (HPT primario)	0	50
Caso Nº 8 (HPT primario)	1	118
Caso Nº 9 (HPT terciario)	9	69
Caso Nº 10 (HPT primario)	0	72

A partir de este resultado cambiamos la fórmula añadiendo insulina a los medios de cultivo con la finalidad de obtener un crecimiento óptimo.

Formula:

F-10 HAM.....100 ml.

L- glutamina.....1 ml.

Penicilina / Estreptomicina.....1.5 – 2 ml.

HEPES.....1.5 ml.

Suero de ternera fetal.....10 ml.

Insulina.....0.04 ml.

Presentamos el resultado de los casos consecutivos:

PACIENTES Nº DE CELULAS DÍAS DE CULTIVO
ANALIZABLES

Caso N° 11 (HPT terciario)	29	128
Caso N° 12 (HPT secundario)	20	78
Caso N° 13 (HPT primario)	0	30
Caso N° 14 (HPT primario)	0	19
Caso N° 15 (HPT primario)	0 (ESTUFA A 60° C)	62
Caso N° 16 (HPT primario)	24	80
Caso N° 17 (HPT/ MEN 1)	22	124
Caso N° 18 (HPT primario)	3	122
Caso N° 19 (HPT secundario)	0 (ESTUFA A 60° C)	134
Caso N° 20 (HPT primario)	CRECIMIENTO (+), NO METAFASES	90
Caso N° 21 (HPT primario)	0 (ESTUFA A 60° C)	254
Caso N° 22 (HPT primario)	0 (ESTUFA A 60° C)	55
Caso N° 23 (HPT primario)	0 (ESTUFA A 60° C)	31
Caso N° 24 (HPT primario)	1	157
Caso N° 25 (HPT secundario)	20	125
Caso N° 26 (HPT primario)	15	99
Caso N° 27 (HPT terciario)	CRECIMIENTO (+) NO METAFASES	156
Caso N° 28 (HPT primario)	CRECIMIENTO (+) NO METAFASES	192
Caso N° 29 (HPT secundario)	10	68

V.2.– Resultados de otros cultivos celulares

Se cultivó simultáneamente un carcinoma de mama (Caso N° 15) utilizando para ello la misma metodología que para el tejido paratiroideo y observamos que el tejido mamario crece más rápidamente. También cultivamos tejido tiroideo del caso N° 28 e igualmente observamos mayor facilidad de crecimiento que en el tejido paratiroideo.

Dado que en el Servicio de Cirugía General "A" (Sección Dr. Cruz Vigo) existe una unidad de criopresevación de tejido paratiroideo, utilizamos el tejido de un criovial que llevaba 4 años bajo dicho proceso e iniciamos su cultivo con la finalidad de ver la actitud de crecimiento y realizar un análisis citogenético. Al inicio del cultivo (primer día) observamos la aparición de hongos, que tratamos con anfotericina, logrando que dicho cultivo continuara, los fibroblastos aparecieron a los 3 días y 20 días más tarde observamos los botones celulares, en total necesitamos 156 días de cultivo y no logramos analizar ninguna metafase.

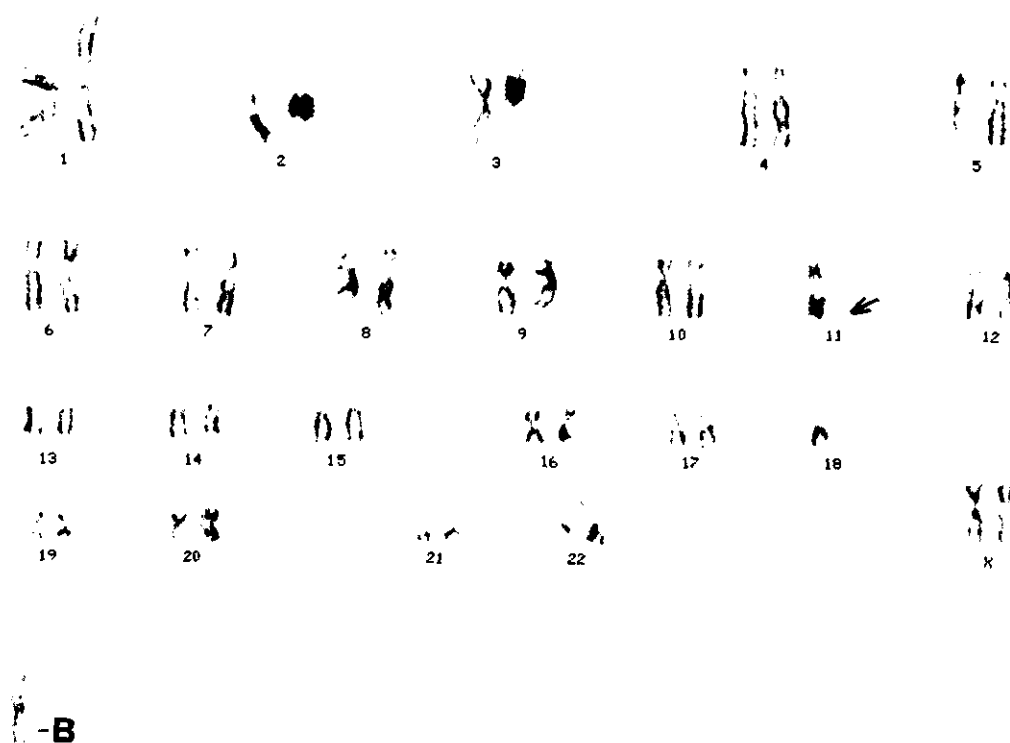
V.3.– Resultados de los hallazgos citogenéticos

CASO N°1

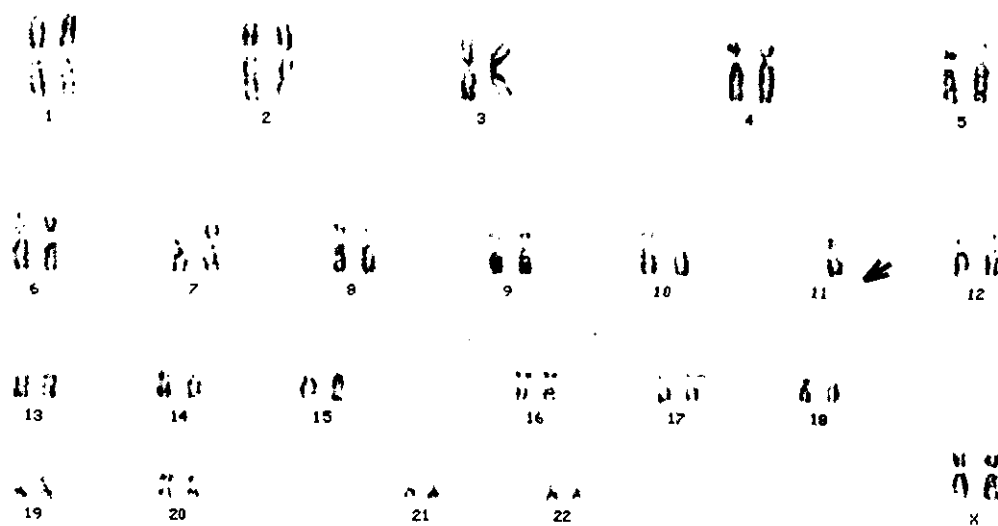
1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
51	(46)	90.19 %	= 46, XX (Normal)
	(1)	1.9 %	= 48, XX +3, +10
	(1)	1.9 %	= 46, XX -2, +18
	(1)	1.9 %	= 45, XX -11, -18, +B
	(1)	1.9 %	= 45, XX, -11
	(1)	1.9 %	= 43, XX, -11, -8, -10

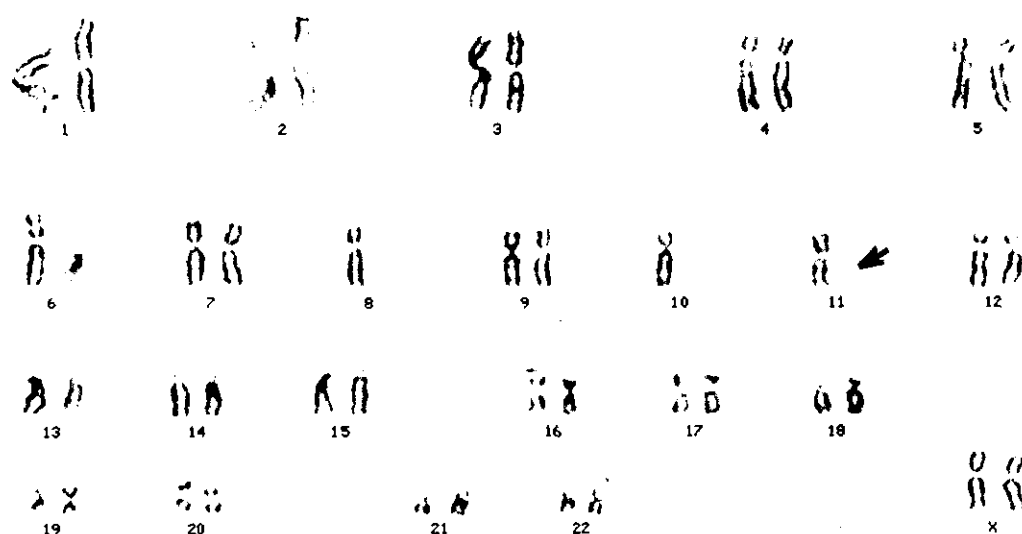
HOSPITAL 12 DE OCTUBRE



En la figura representamos la metafase 45, XX -11, -18, +B. La flecha señala la pérdida del cromosoma 11.



Cariotipo 45, XX, -11



Cariotipo **43, XX, -11, - 8, -10** (en sangre periférica encontramos en tres células la pérdida del cromosoma 11, correspondiendo al 3.92 % del total de las metafases analizadas).

2).- En tejido paratiroideo (adenoma):

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
64	(58)	90.62 %	= 46, XX (Normal)
	(3)	4.68 %	= 46, XX +D, +G, -17, -11
	(2)	3.12 %	= 45, XX -15
	(1)	1.56 %	= 44, XX -5, -20



El cariotipo mostrado corresponde a 46, XX +D, +G, -17, -11, donde encontramos 3 metafases (clon) con la pérdida del cromosoma 11 (flecha) y del 17.

CASO N° 2

1).- En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
100	(90)	90.0	% = 46, XY (Normal)
	(2)	2.0	% = 45, XY -17
	(2)	2.0	% = 45, XY -12
	(1)	1.0	% = 47, XY +G
	(1)	1.0	% = 48, XY +F, +G
	(1)	1.0	% = 44, XY -19, -20, 22q+
	(1)	1.0	% = 48, XY +16, +F
	(1)	1.0	% = 44, XY, 3p roto, -7, -20
	(1)	1.0	% = 40, XY, -7, -10, -12, -17, -18, - 20



Cariotipo 40, XY -7, -10, -12, -17, -18, -20 (las flechas señalan la pérdida de los cromosomas).

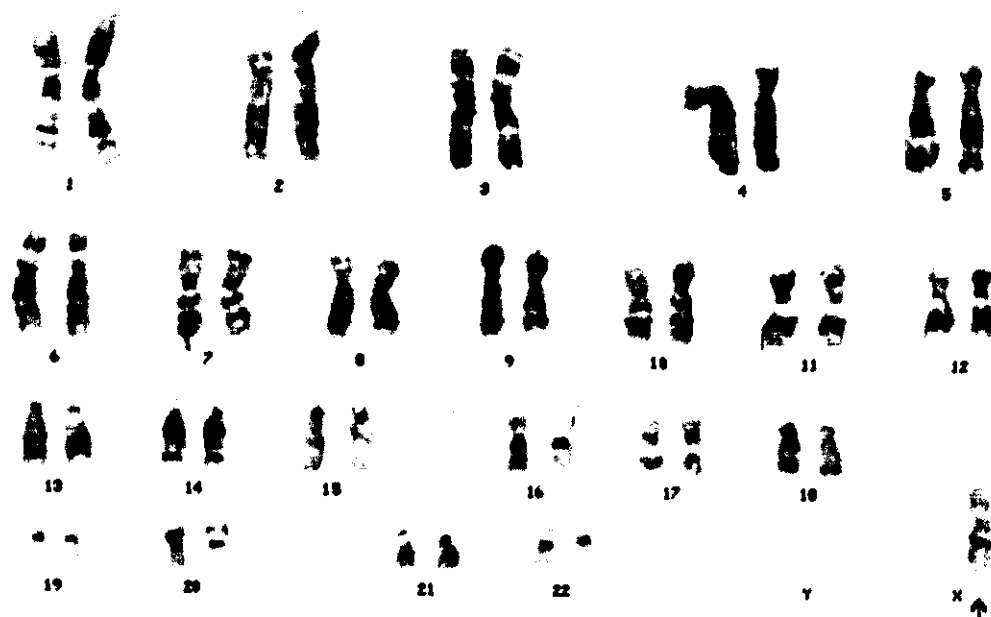
2).- El tejido paratiroideo no creció.

CASO N° 3

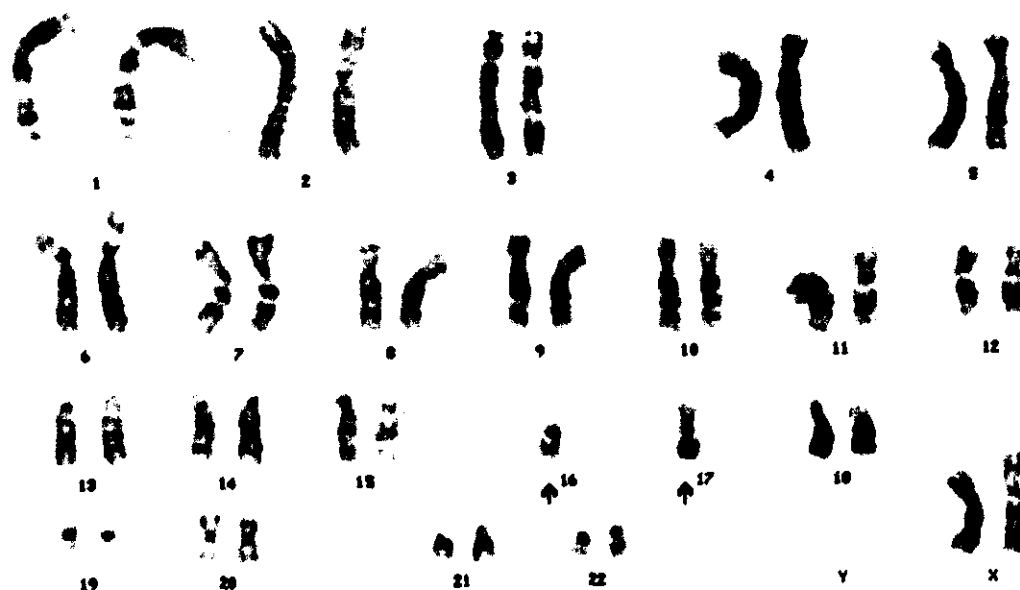
1).- En sangre periférica:

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
75	(52)	69.33	% = 46, XX (Normal)
	(22)	29.33	% = 44, XX -16, -17
	(1)	1.33	% = 45, X, -X
	* En un 41% se observo fragilidad de "11q"		



Cariotipo 45, X - X



Cariotipo 44, XX -16, -17. Encontrado en 22 células y representa el 29.33% del total de las metafases estudiadas (las flechas señalan los cromosomas perdidos).

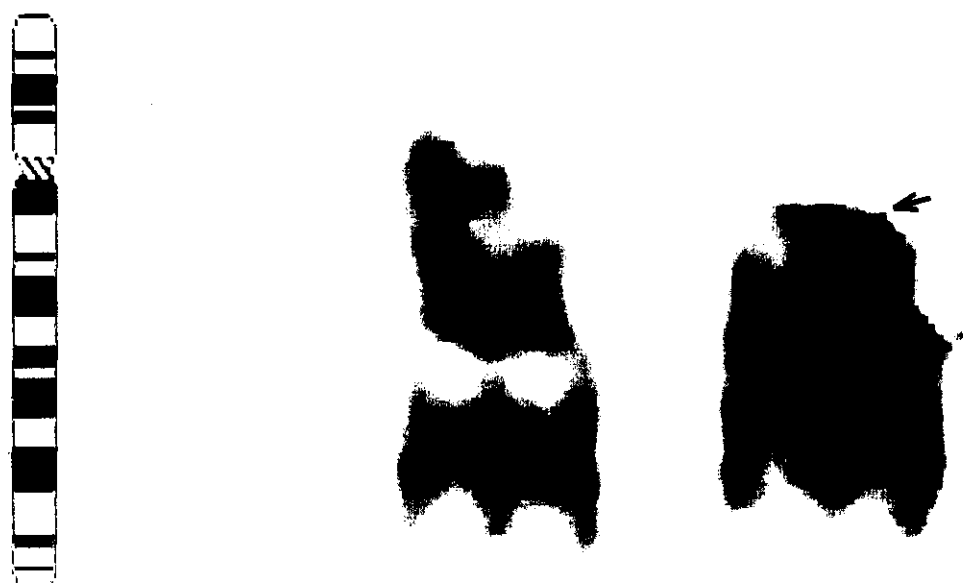
2).- En tejido paratiroideo (adenoma):

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
1	(1) 100	% = 46, XX	(Normal)

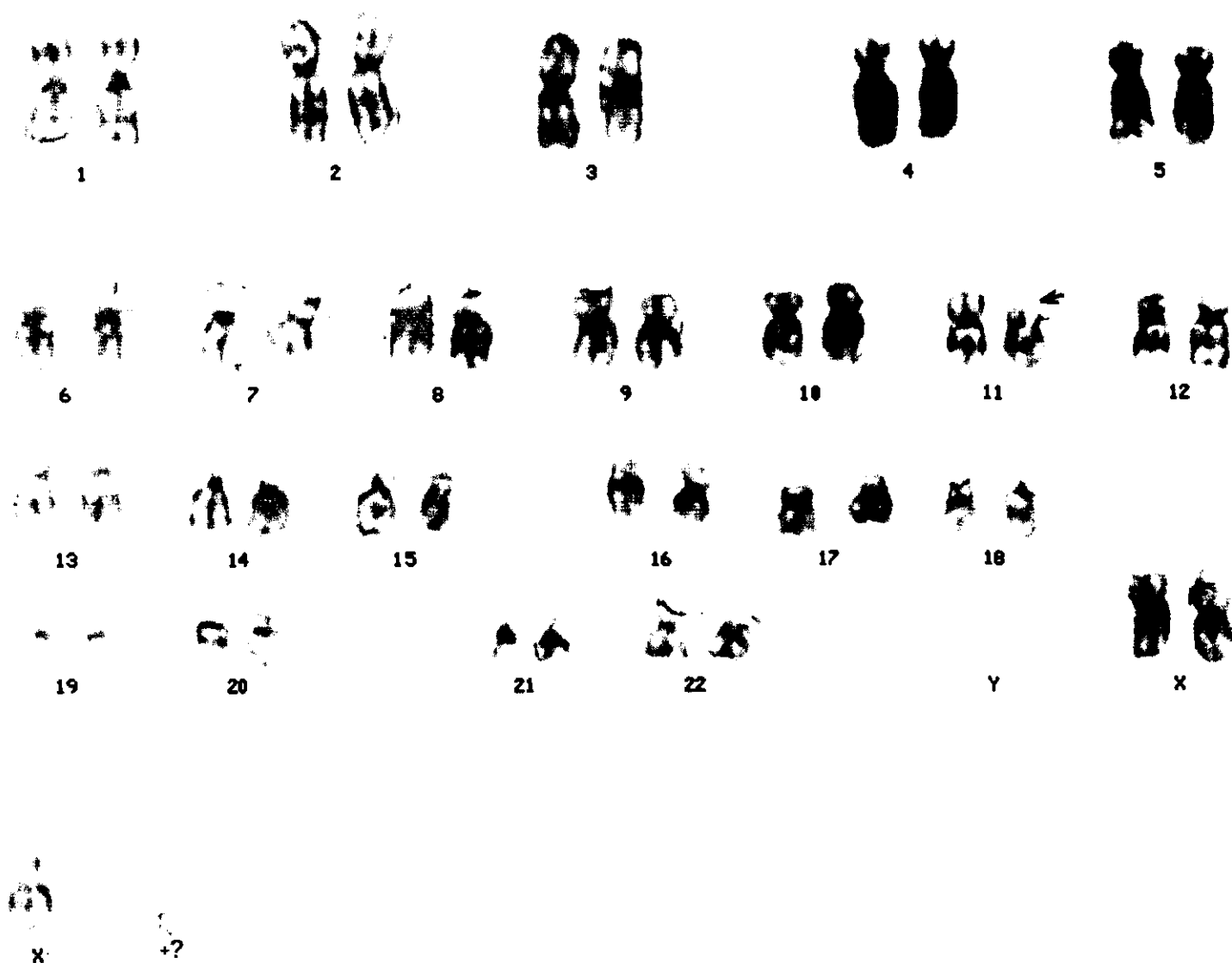
CASO N^o 4

1).– En sangre periférica:

N ^o de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
90	(59)	65.5 %	= 46, XX, 21s+, 13s+ (Normal)
	(22)	24.4 %	= < 46, [cromosomas perdidos: -1, -X, -18, -19]
	(3)	3.3 %	= 46, XX, 11p-
	(3)	3.3 %	= 47, XXX
	(2)	2.2 %	= 48, +Frag
	(1)	1.1 %	= 47, XXX, 11p-, +?



Ampliación del cromosóma 11(par), la flecha señala la pérdida de ADN de los brazos cortos.



Cariotipo 47, XXX, 11p-, +? (la trisomía X fue encontrada en 4 metafases y representa el 4.4% de las células estudiadas).

2).- En tejido paratiroideo (adenoma):

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
4	(2)	50 %	= 46, XX (Normal)
	(1)	25 %	= 46, XX, 11p+, ¿17?
	(1)	25 %	= 44, XX -18, -D



Ampliación del par 11, donde se observa ganancia de ADN (11P+).

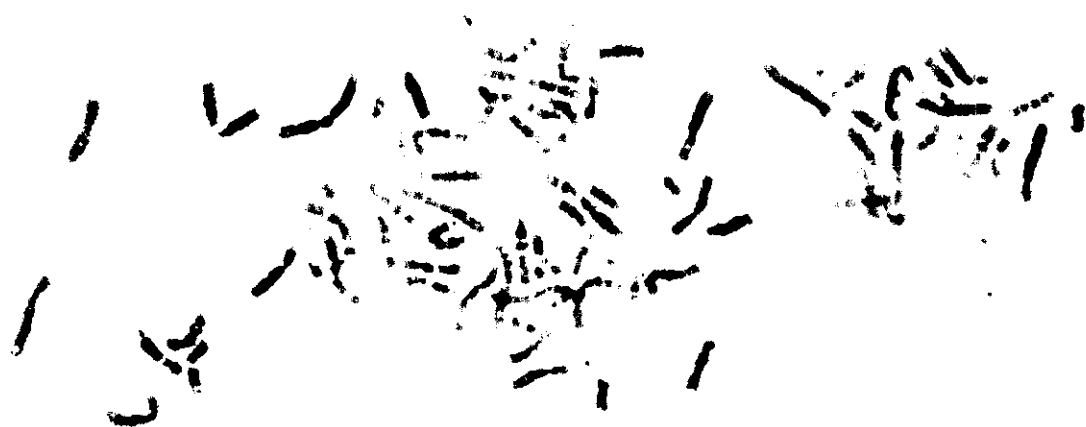


Cariotipo 46, XX, 11p+, ¿17?

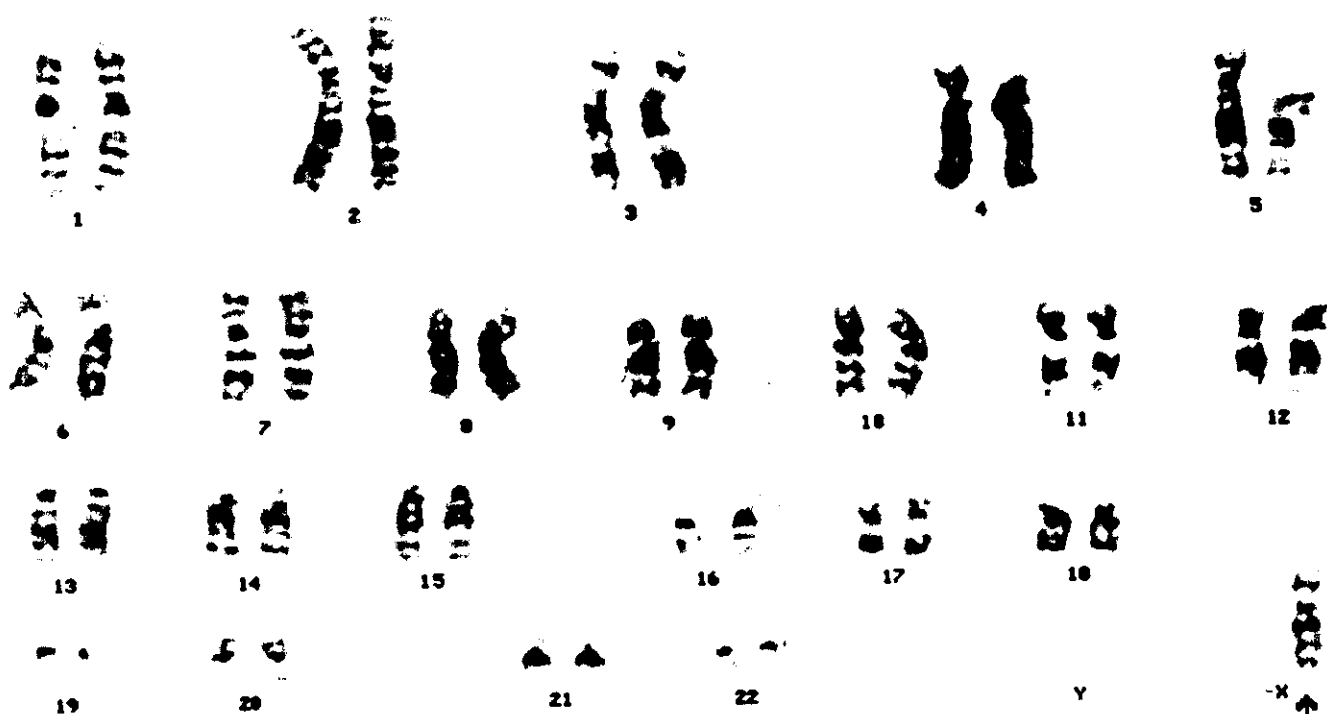
CASO N° 5

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
140	(86)	61.42 %	= 46, XX, (Normal)
	(29)	20.71 %	= poliploidías
	(11)	7.86 %	= 46, XX, [Roturas en 11q24]
	(5)	3.57 %	= 47, XX, +20
	(5)	3.57 %	= 45, X -X
	(4)	2.85 %	= Triploidías



Poliploidías



Caritotipo 45, X -X. (clon de 5 células)

2).- El tejido paratiroideo se
contaminó

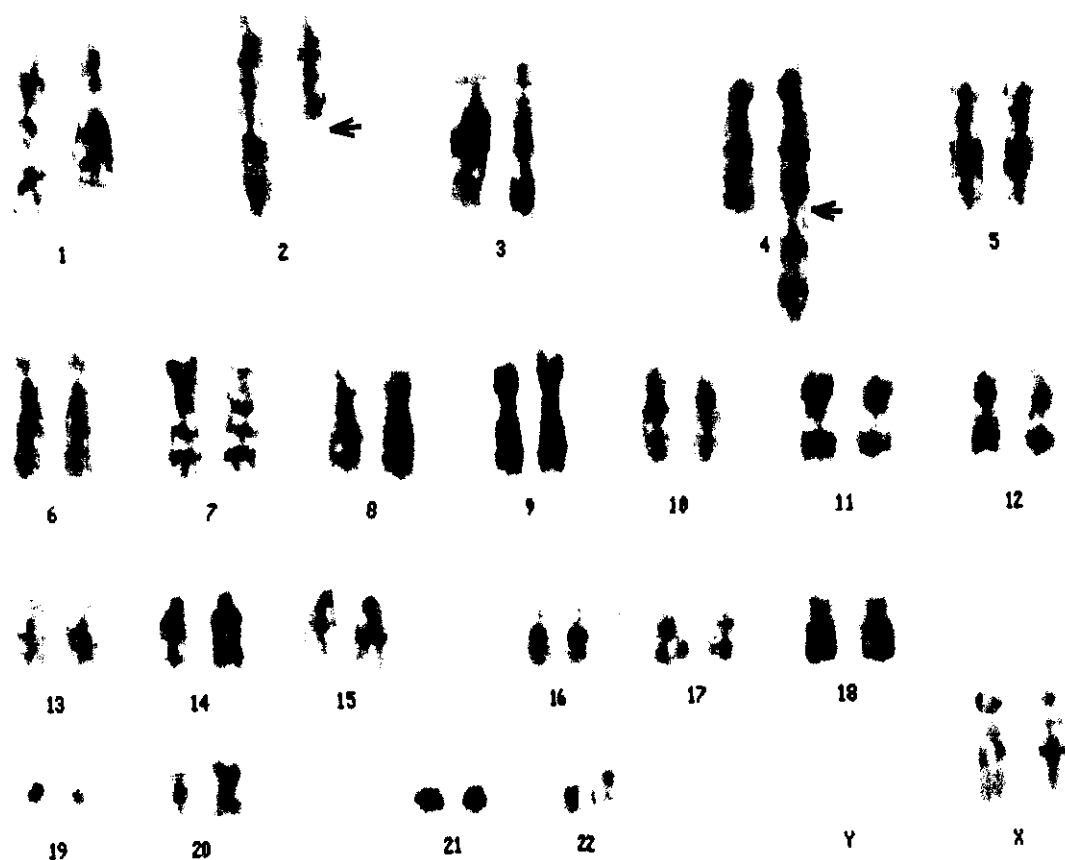
CASO N° 6

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
77	(42)	54.54	% = 46, XX, (Normal)
	(22)	28.57	% = < 44 cromosomas
	(6)	7.79	% = Triploidías
	(5)	6.49	% = Tetraploidías
	(1)	1.29	% = 47, XX, +11
	(1)	1.29	% = 46, XX, t(4;2)

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia):

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
46	(32)	69.56	% = 46, XX (Normal)
	(11)	23.91	% = < 46 cromosomas
	(2)	4.34	% = > 69 cromosomas
	(1)	2.17	% = 46, XX, 13q–



Cariotipo en sangre periférica: 46, XX, t(2;4), las flechas señalan la traslocación con involucración del cromosoma 2 que pierde los brazos largos y el cromosoma 4 los gana.

CASO N° 7

1).- En sangre periférica:

Nº de metafases
analizadas

	n	%	Hallazgos
59	(34)	57.52	% = 46, XX, (Normal)
	(14)	23.72	% = < 40 - 45 cromosomas
	(10)	16.94	% = 46, XX,[Roturas 11q]
	(1)	1.69	% = 46, XX, 2q-

2).- El tejido paratiroideo (adenoma) no creció.

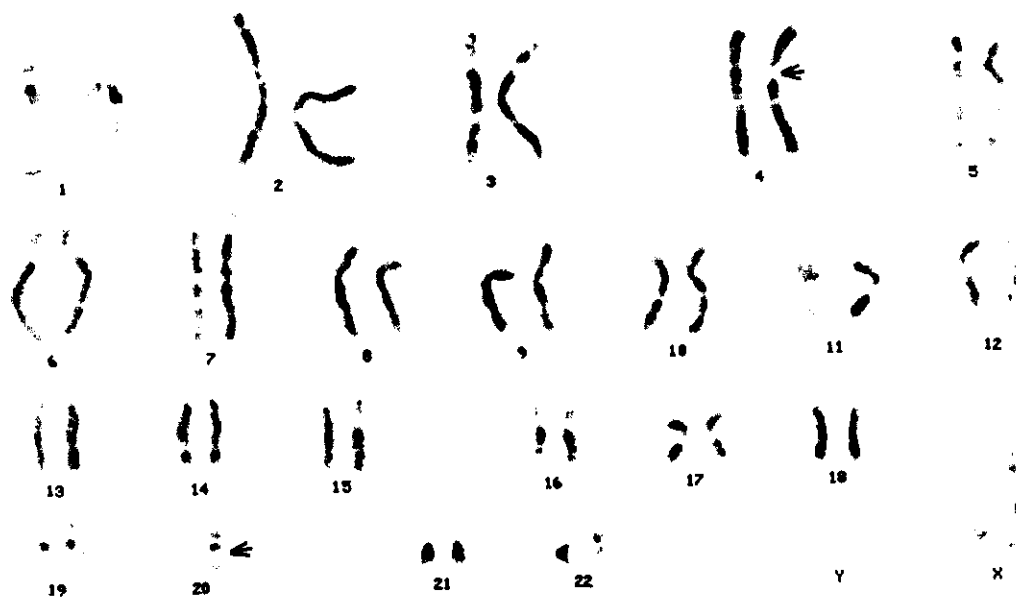
CASO N° 8

1).- En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
50	(35)	70.0	% = 46, XX, 13s+, 21s+ (Normal)
	(7)	14.0	% = < 45 cromosomas variables
	(5)	10.0	% = 46, XX, [Roturas Xq13]
	(1)	2.0	% = 46, XX, -20, +p, +rotura 4q
	(1)	2.0	% = 46, XX, ¿X?, ¿q?
	(1)	2.0	% = 46, +3 grande

2).- En tejido paratiroideo (Adenoma).

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
1	(1)	100	% = 46, XX, ¿6?, ¿3?



+P

Cariotipo en sangre periférica (caso N° 8); 46, XX, -20, +p, +rotura en 4q.

CASO N° 9

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases
analizadas

0	Los leucocitos no crecen y a pesar de subcultivarlos: se considera "como actitud extraña".
---	--

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia).

Nº de metafases
analizadas

	n	%	Hallazgos
9	(7)	77.7	% = 46, XX
	(1)	11.1	% = 46, XX, +13, -12, 4p-
	(1)	11.1	% = 46, XX, 3q13 roto

CASO N° 10

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
50	(30)	60.0	% = 46, XY, q+, 9mo, 21s+
	(20)	40.0	% = 46, XY, [Roturas en 3q11, 5q14, 5q34, 10q22, 1p36]

2).– El tejido paratiroideo (adenoma) no creció.

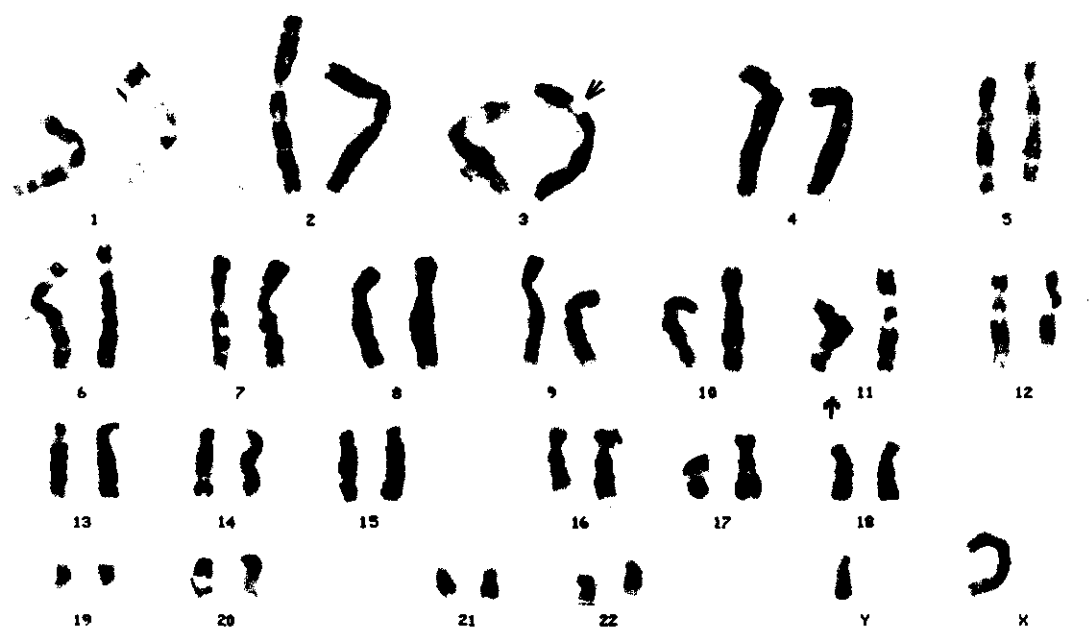
CASO Nº 11

1).- En sangre periférica:

Nº de metafases
analizadas

n % Hallazgos

62	(41)	66.2	% = 46, XY
	(10)	16.1	% = 45, XY, -21
	(5)	8.0	% = 46, XY, [Rotura 3p13], ¿11?
	(3)	4.8	% = Cromosoma 16 no homologo
	(2)	3.2	% = 46, XY, Deleción 5q
	(1)	1.6	% = 46, XY, t(C;6)



Cariotipo correspondiente a; 46, XY, 3p13 roto, ¿11?.(la flecha señala la zona de la rotura, el cromosoma 11 nos parecio raro)

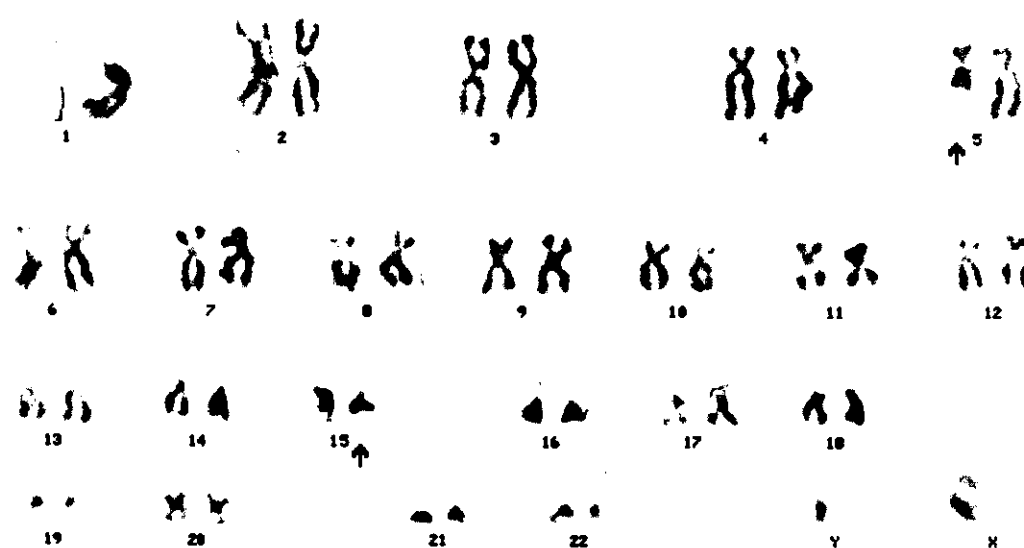


Cariotipo corespondiente a; 46, XY, del (5)(q2-q3)

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia).

Nº de metafases
analizadas

	n	%	Hallazgos
29	(12)	41.37 %	= 46, XY (Normal)
	(9)	31.03 %	= Tetraploidías
	(7)	24.13 %	= < 46 cromosomas
	(1)	3.44 %	= 46, XY, 5q–, 15q–



Cariotipo de tejido paratiroideo correspondiente a: 46, XY, 5q-, 15q-.

CASO N° 12

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
30	(30)	100	% = 46, XX

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia).

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
20	(13)	65.0	% = 46, XX
	(5)	25.0	% = < 46 cromosomas
	(2)	10.0	% = 46, XX, +C



↖
+C

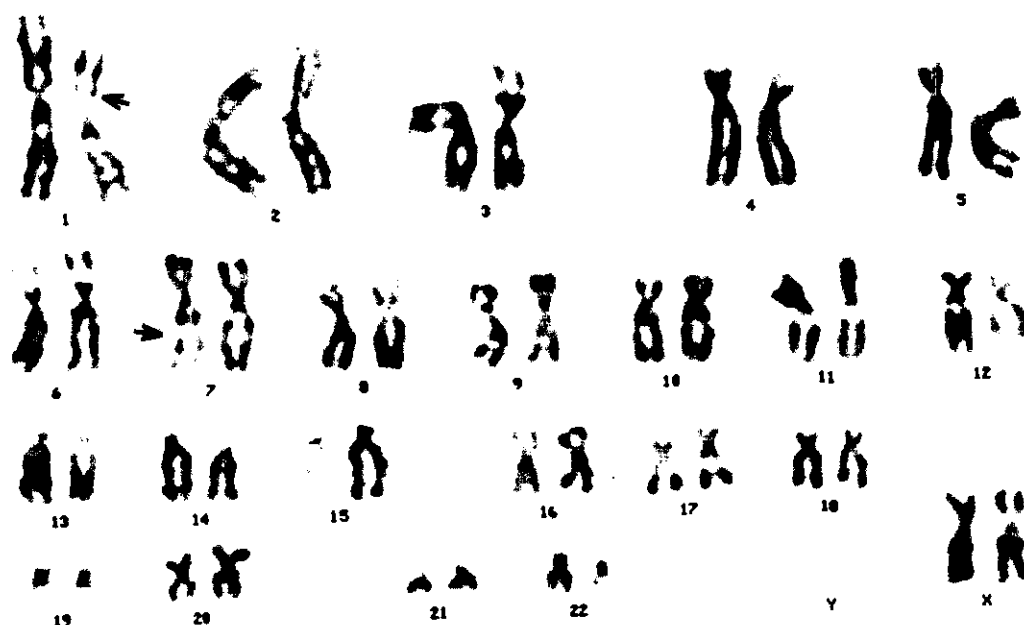
Cariotio del tejido paratiroideo correspondiente a; 46, XX, +C. (la flecha señala el fragmento adicinal)

CASO N° 13

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
30	(28)	93.33	% = 46, XX, 22s+
	(2)	6.66	% = 46, XX, 1p y 7q 22 Rotos

2).– El tejido paratiroideo (adenoma) no creció.



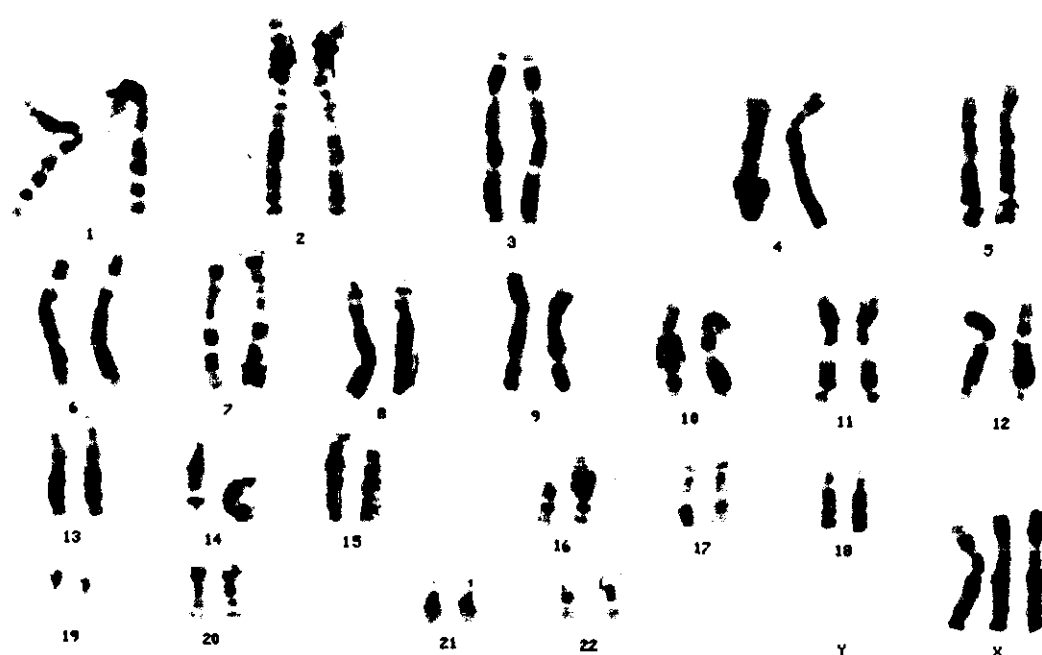
Cariotipo en sangre periférica correspondiente a: 46, XX, 1p roto, 7q22 roto (las flechas señalan la zonas cromosómicas rotas).

CASO N° 14

1).- En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
92	(69)	75.00	% = 46, XX
	(15)	16.30	% = < 44 cromosomas
	(4)	4.34	% = 47, XXX
	(3)	3.26	% = 45, X, -X
	(1)	1.09	% = 46, +DM, -C

2).- El tejido paratiroideo (adenoma) no creció.



Cariotipo de sangre periférica correspondiente a: 47, XXX (clon celular).

CASO N° 15

1).- En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
52	(46)	88.5 %	= 46, XX, 21s
	(3)	5.7 %	= 45, XX, -3
	(3)	5.7 %	= > 91 Cromosomas

2).- El tejido paratiroideo crecio bien, sin embargo la estufa se calento a 60° C, destruyendo de esta forma la muestra celular.

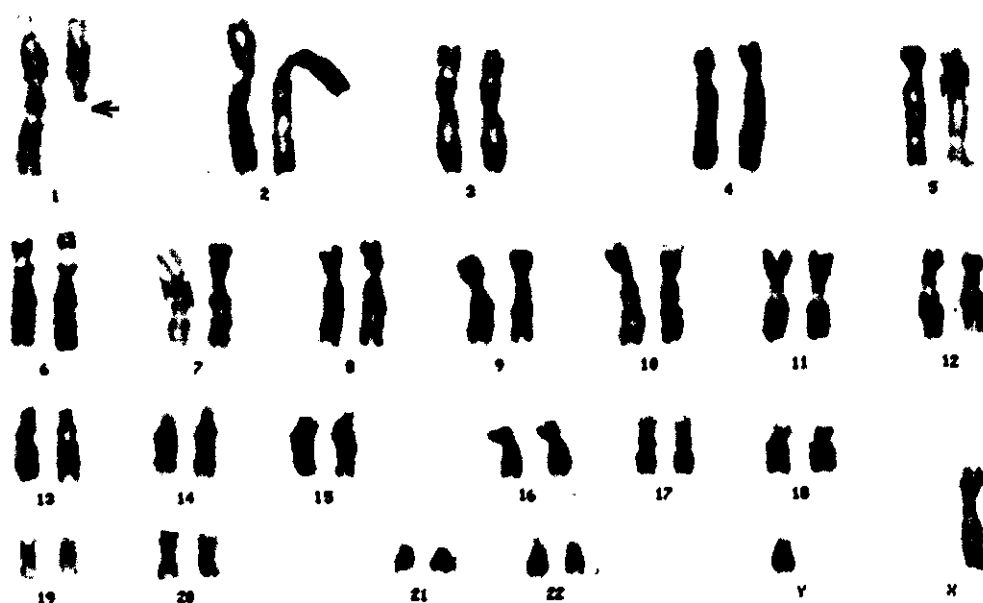


Cariotipo en sangre periférica: 45, XX, 21s+, -3 (Clon celular).

CASO N° 16

1).- En sangre periférica:

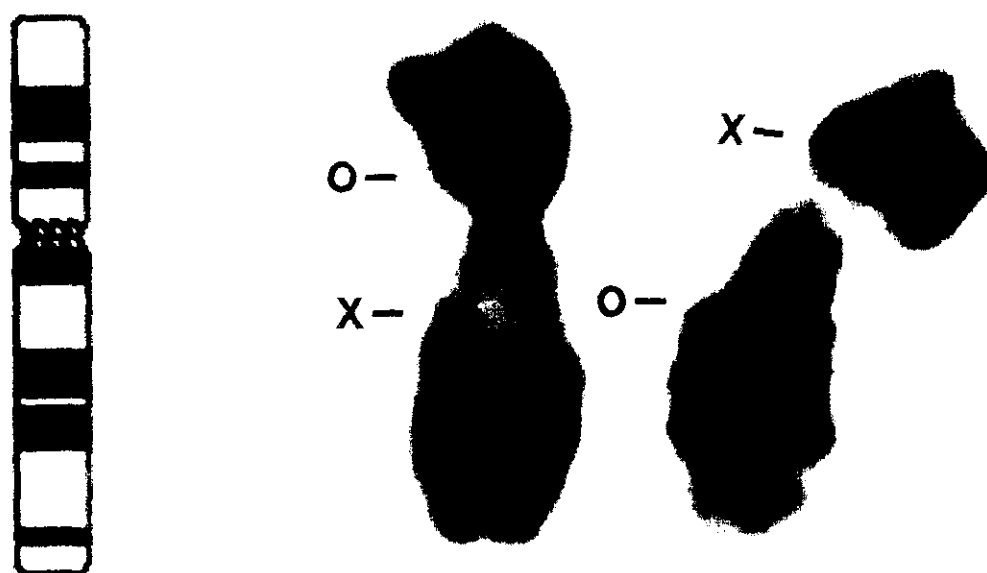
Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
110	(84)	76.36	% = 46, XYq+, 9qh+, 15s+
	(10)	9.00	% = 45, X, -Y
	(7)	6.36	% = 46, XY, INV 11
	(5)	4.54	% = > 92 cromosomas
	(2)	1.81	% = 46, XYq+, 9qh, 15s+, [Roturas: Xq, 2q25, 20qh]
	(1)	0.90	% = 46, XY, DEL (1q)
	(1)	0.90	% = 47, XY, Mar



Cariotipo correspondiente a; 46, XY, del (1q). La flecha marca la pérdida del ADN de los brazos largos del cromosoma 1.



Cariotipo correspondiente a; 46, XY, Inv 1.1 La flecha marca los brazos largos del cromosoma 11.



Ampliación del cromosoma 11 donde mostramos la inversión.

2).– En tejido paratiroideo (Adenoma).

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
24	(9)	37.5	% = 46, XY
	(6)	25.0	% = 45, XY, -11
	(6)	25.0	% = < 46 cromosomas
	(3)	12.5	% = Poliploidía



Cariotipo de tejido paratiroideo correspondiente a; 45, XY, -11 (Clon celular encontrado en el 25% de las metafases analizadas)

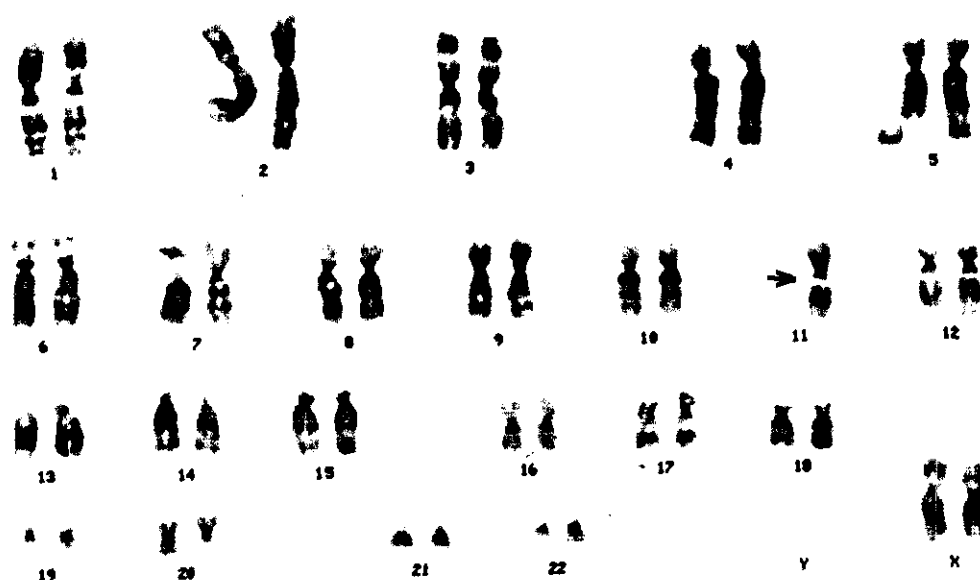
CASO N° 17

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
50	(40)	80.0	% = 46, XX, 15s+, 21s+, 22s+
	(5)	10.0	% = 46, XX, 5q 23– 31 roto
	(5)	10.0	% = 45, XX, –17

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia por MEN I):

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgo
22	(10)	45.45	% = 46, XX
	(10)	45.45	% = 45, XX, –11
	(2)	9.09	% = poliploidía



Cariotipo del tejido paratiroideo hiperplásico del MEN 1, donde predomina la ausencia del cromosoma 11 en el 45.45%.

CASO N° 18

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
50	(44)	88.0	% = 46, XX, 22s+,
	(3)	6.0	% = 46, XX, 22s+, [5q15, 9q13, 1ph rotos]
	(3)	6.0	% = 45, XX, -12

2).– En tejido paratiroideo (adenoma).

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
3	3	100	% = 45, XX, -12



Cariotipo correspondiente al tejido paratiroideo; 45, XX, -12 [clon]. (Este hallazgo coincide con el clon celular de la sangre periférica).

CASO N° 19

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
35	(34)	97.14	% = 46, XX,
	(1)	2.85	% = 47, XX, +22

2).– El tejido paratiroideo se alteró por elevación de la temperatura a 60°C debida a problemas con la estufa de cultivos.

CASO N° 20

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
27	(27)	100	% = 46, XX,

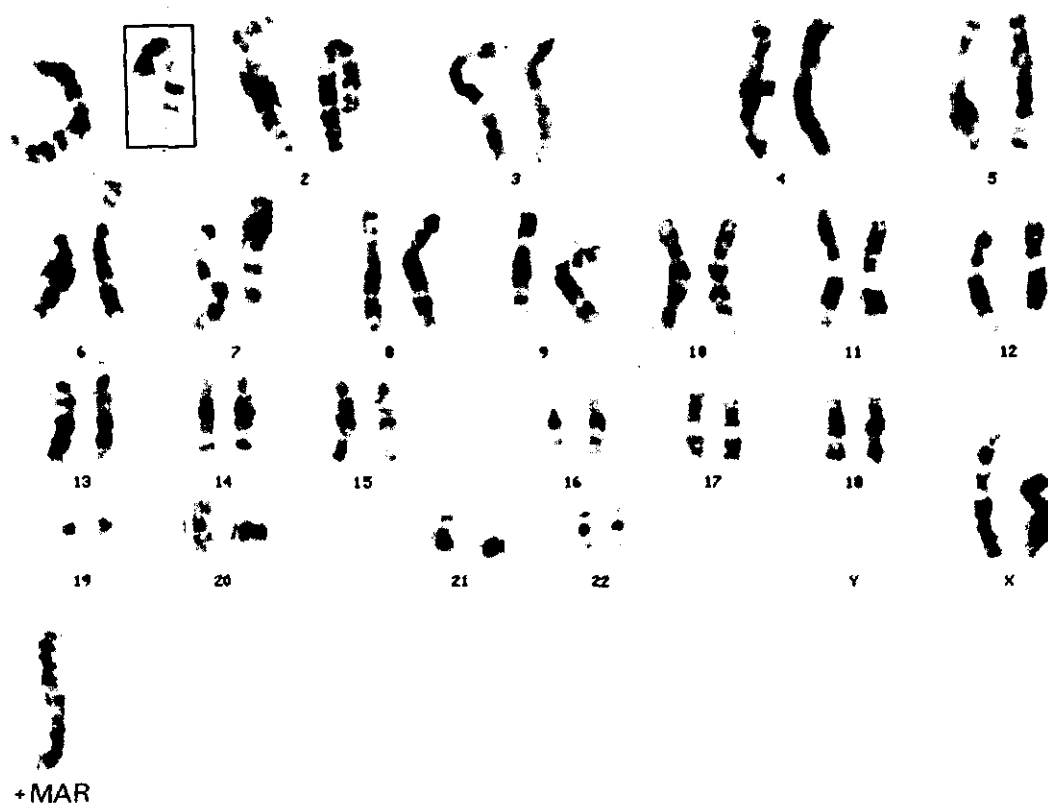
2).– El tejido paratiroido creció bien, sin embargo no fue posible observar metafases

CASO N° 21

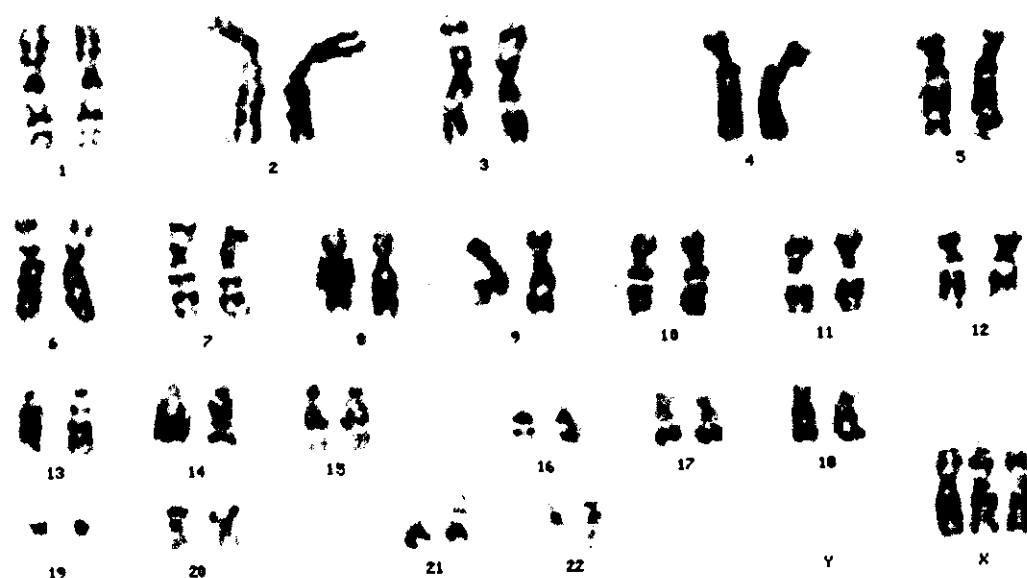
1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
53	(39)	73.58	% = 46, XX,
	(5)	9.43	% = 47, XXX
	(3)	5.66	% = 45, X, -X
	(2)	3.77	% = < 45 cromosomas
	(1)	1.88	% = 47, XX, +G
	(1)	1.88	% = 47, XX, 1p-, +mar
	(1)	1.88	% = 47, XX, +mar
	(1)	1.88	% = ¡46-47!, ¡XX!, ¡2!, ¡3!

2).– El tejido paratiroideo (Adenoma), sufrió daños tras problemas con la estufa al subir la temperatura a 60°C.



Cariotipo correspondiente a: 47, XX, 1p-, + mar, la flecha señala el cromosoma marcador y el cuadro enmarca el cromosoma 1 con ganancia de ADN en los brazos cortos.



Cariotipo correspondiente al clon celular; 47, XXX, este hallazgo sucedió en 5 células.

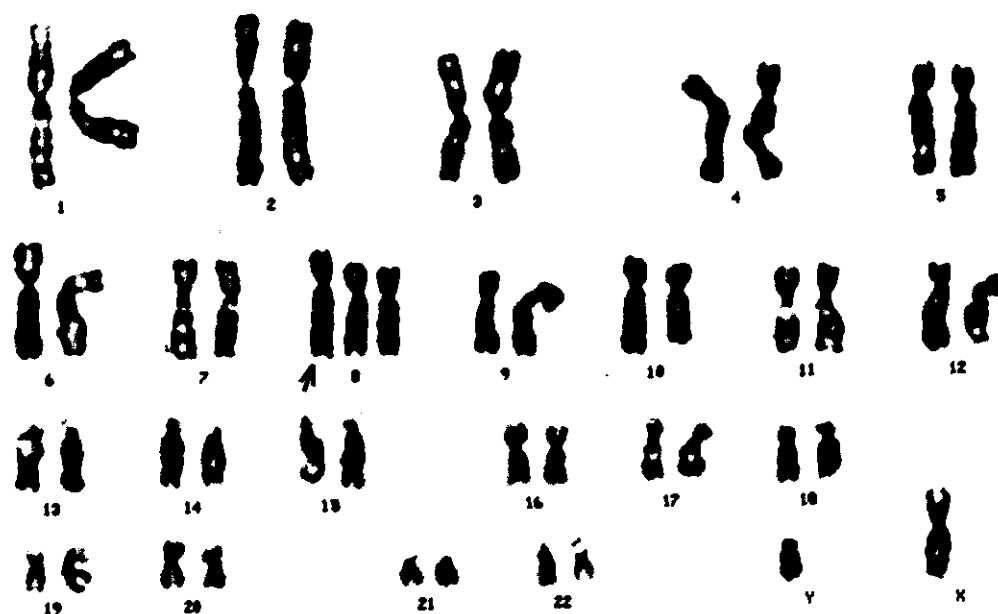
CASO N° 22

1).- En sangre periférica:

N° de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
56	(41)	73.21	% = 46, XYq+, 9qh+, 21s+, 22s+
	(5)	8.92	% = 47, XYq+, +8, 9qh+, 22s+
	(5)	8.92	% = 46, XYq+, [1qh, 5qh, 1p32, 2q35, 4p13 Rotos, + frag]
	(3)	5.35	% = < 44 cromosomas
	(1)	1.78	% = 45, X, -Y
	(1)	1.78	% = 44, XY, -19, -20

2).- El tejido paratiroideo (Adenoma), sufrió daños tras problemas con la estufa al subir la temperatura a 60°C.



Cariotipo correspondiente a: 47, XYq+, +8, 9qh+, 22s+, hallazgo en 5 células (8.9%)

CASO N° 23

1).– En sangre periférica:

N° de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
25	(20)	80.0	% = 46, XY
	(5)	20.0	% = 46, XY, 16 no homologo

2).– El tejido paratiroideo (Adenoma), crecía perfectamente, sin embargo sufrió daños tras problemas con la estufa al subir la temperatura a 60°C.

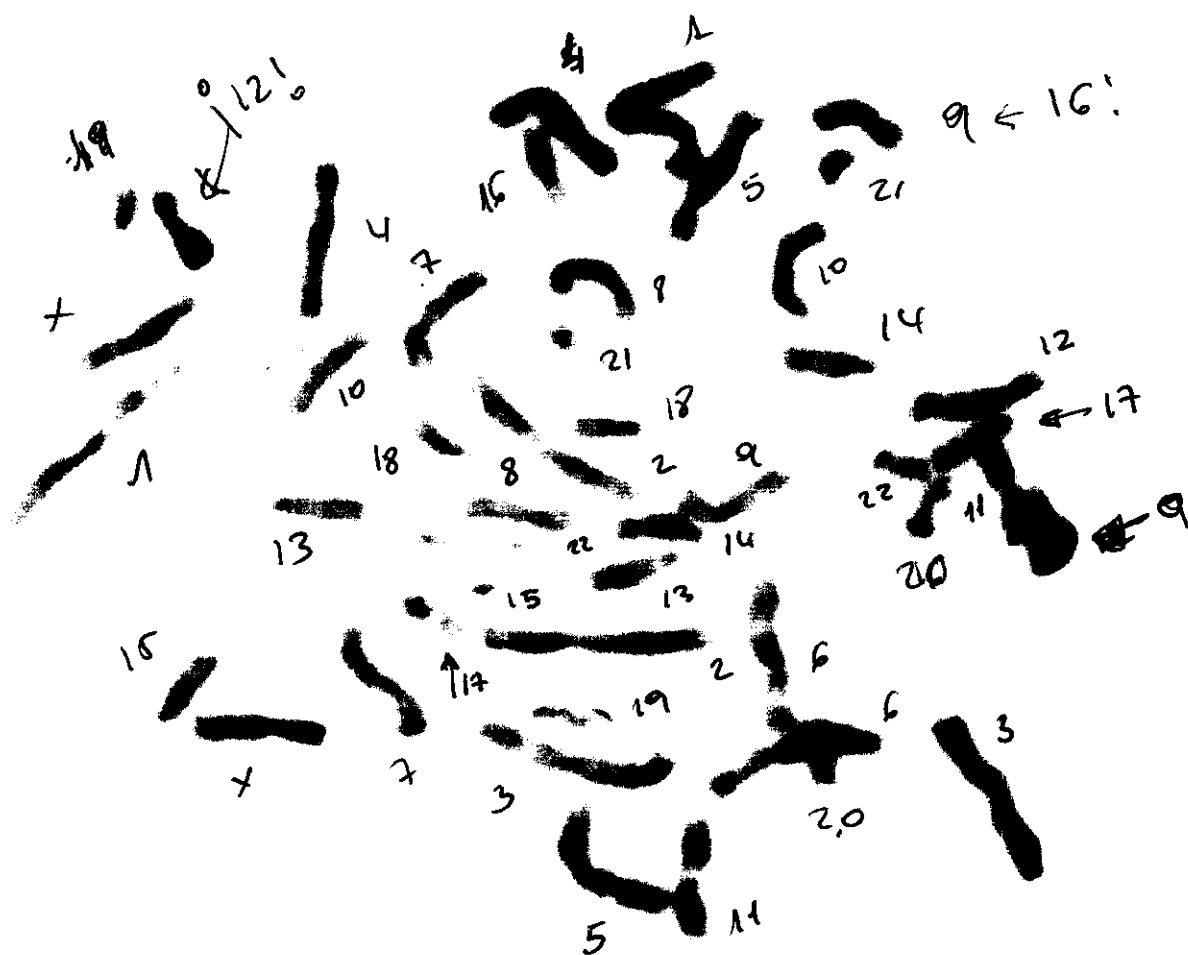
CASO N° 24

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
31	(11)	35.48	% = 46, XX, 21s+
	(17)	54.83	% = 46, XX, 21s+, 12q–
	(3)	9.67	% = 47, XX, +2, 21 s+

2).– En tejido paratiroideo (Adenoma).

Nº de metafases analizadas	n	%	Hallazgos
1	1	100	% = < 44 cromosomas



Cariotipo correspondiente a sangre periférica del caso N° 24: 46, XX, 21st+, 12q-

CASO N° 25

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases

analizadas

n

%

Hallazgos

25

(25)

100

% = 46, XY

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia):

Nº de metafases

analizadas

n

%

Hallazgos

20

20

100

% = 46, XY

CASO Nº 26

1).– Sangre periférica:

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
25	25	100	% = 46, XX

2).– En tejido paratiroideo (adenoma):

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
15	15	100	% = < 46 cromosomas

CASO N° 27

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgo
30	30	100	% = 46, XY

2).– El tejido paratiroideo (Hiperplasia por HPT terciario) creció perfectamente, sin embargo no fue posible analizar ninguna metafase.

CASO N° 28

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
40	(21)	52.5	% = 46, XX
	(13)	32.5	% = 46, XX, 12p–, 18p–
	(6)	15.0	% = 45, XX, –V

En este caso se cultivó tejido paratiroideo (Hiperplasia por HPT primario) y tejido tiroideo (Bocio); el tejido tiroideo creció con más rapidez que el paratiroideo, sin embargo en ambos casos no fue posible analizar ninguna metafase.



Cariotipo correspondiente a la sangre periférica del Caso N° 28: 46, XX, 12p-, 18 p- (las flechas señalan la pérdida de ADN en ambos cromosomas).

CASO N° 29

1).– En sangre periférica:

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
7	(7)	100	% = 46, XX

2).– En tejido paratiroideo (Hiperplasia por HPT secundario):

Nº de metafases

analizadas	n	%	Hallazgos
10	10	100	% = > 46 cromosomas



Cariotipo del tejido paratiroideo (Hiperplasia), donde observamos una poliploidía; > 46 cromosomas.

V.4.- Resultados del grupo control

Sexo	Edad	Cariotipo
1.- Mujer	43 años	46, XX.
2.- Mujer	46 años	46, XX.
3.- Mujer	45 años	46, XX.
4.- Mujer	46 años	46, XX.
5.- Mujer	46 años	46, XX.
6.- Mujer	47 años	46, XX.
7.- Mujer	46 años	46, XX.
8.- Mujer	40 años	46, XX.
9.- Mujer	40 años	46, XX.
10.- Mujer	54 años	46, XX.
11.- Mujer	30 años	46, XX.
12.- Mujer	50 años	46, XX.
13.- Mujer	29 años	46, XX.
14.- Mujer	34 años	46, XX.
15.- Varón	44 años	46, XY.
16.- Varón	47 años	46, XY, q+.
17.- Varón	44 años	46, XY.
18.- Varón	43 años	46, XY, q+.
19.- Varón	44 años	46, XY.
20.- Varón	40 años	46, XY.
21.- Varón	43 años	46, XY, q+.
22.- Varón	40 años	46, XY, / en una metafase 46, XY, ¿5?.
23.- Varón	42 años	46, XY.
24.- Varón	46 años	46, XY, 22s+.
25.- Varón	39 años	46, XY, / en una metafase 45, X, -Y.
26.- Varón	31 años	46, XY.
27.- Varón	49 años	46, XY.
28.- Varón	43 años	46, XY.
29.- Varón	38 años	46, XY.

HOSPITAL 12 DE OCTUBRE



Servicio de Genética
Caso 7186 Porta u Celula 1
Cariotipo 46XY
Observaciones
Paciente, Rostro genético
Fecha 30 March 1994

Cariotipo 46, XY, correspondiente al grupo control (normal).

V.5.- Resultados del análisis estadístico

En nuestro estudio presentamos los casos clínicos de 18 pacientes afectados de hiperparatiroidismo primario (HPTp), 17 adenomas y una hiperplasia. El resto del grupo de pacientes se compone de 7 pacientes afectados de hiperparatiroidismo secundario (HPTs), 3 de hiperparatiroidismo terciario (HPTt) y un paciente con un MEN I.

Ocho (27.6%) eran varones y 21 (72.4%) mujeres, [$p < 0.001$].

Los valores medios de calcio sérico preoperatorio en general fueron 11.6 (R: 10.3 – 14.7) mg/dl. No existió diferencia estadística comparando los valores de Ca preoperatorio del grupo de HPT primario [11.64 mg/dl] vs HPT renal (HPTr) [11.68 mg/dl].

A las 24 horas de la Cirugía paratiroidea los valores medios del calcio sérico fueron de 7.67 mg/dl para el HPTp y de 8.42 mg/dl para el HPTr, existiendo estadísticamente una diferencia [$p < 0.0001$] con respecto al Ca preoperatorio. No existe diferencia estadística comparando ambos grupos.

Las cifras de Ca se mantienen dentro de la normalidad; 9.06 mg/dl para el HPTp y 9.22 mg/dl para el HPTr, durante una media de seguimiento de 14 meses (R: 4 – 37 meses) para el grupo en general. Esta normalidad de los valores de Ca se mantienen con una diferencia estadística muy significativo [$p < 0.0001$] con respecto a los valores preoperatorios en ambos grupos, sin embargo sigue sin existir diferencia estadística comparando ambos grupos entre sí.

Los valores medios de la molécula intacta de la hormona paratiroidea (PTHmi) en el preoperatorio fueron, en el grupo en general, de 364.3 (R: 72.5 – 1533) pg/ml. Los valores medios preoperatorios de la PTHmi en el HPTp fueron de 264.3 pg/ml y de 565 pg/ml para el HPTr. Comparamos estadísticamente la diferencia entre los valores preoperatorios de la PTHmi de ambos grupos y fue significativa [$p < 0.0001$].

Los pacientes con un HPTp por adenoma presentaron una caída de la PTHmi muy importante (21.4 pg/ml) a los 30 minutos de se exéresis, estadísticamente significativa

[$p < 0.0001$] con respecto a las cifras medias preoperatorias. Esta diferencia se mantiene durante los meses de seguimiento.

La PTHmi fue indetectable a los 30 minutos de la paratiroidectomía total en los pacientes con un hiperparatiroidismo por hiperplasia, situación que se mantiene hasta aproximadamente unos 2.8 meses de la Cirugía, estos resultados son estadísticamente significativos [$p < 0.0001$] con respecto al los valores preoperatorios.

El grupo de pacientes, en general, presentó una clínica caracterizada por síntomas renales en un 51.7% (N = 15), de los cuales predominaron los cólicos renoureterales (80%); la poliuria estuvo presente en 4 pacientes. Los síntomas osteoarticulares se presentaron en 19 pacientes (65.5%) y predominó el dolor, en el 100% de los casos. En tres pacientes se complementó el cuadro con deformidad ósea. Dos pacientes (6.9%) presentaron un cuadro depresivo. La hipertensión arterial se presentó en 17 (58.6%) pacientes. Cuatro (13.8%) pacientes presentaron una hipercalcemia asintomática.

En 13 pacientes (44.8%) se detectó litiasis renoureteral, y el 90% de los mismos necesitaron tratamiento con litotricia. Dos de los pacientes presentaron nefrocalcinosis y precisaron cirugía urológica.

En la radiografía ósea se detectó osteoporosis en 15 pacientes (51.7%) y sólo un paciente presentó osteítis fibrosa quística.

En el cultivo "*in vitro*" de tejido paratiroideo los fibroblastos aparecieron a los 6.6 días y se observaron colonias celulares 7 días más tarde. El tiempo medio requerido para analizar una metafase fue de 91.9 días (Rango: 3 – 254 días). En total cultivamos 29 muestras de tejido paratiroideo de las cuales, en 23 muestras (79.31%), el tejido paratiroideo creció y en 15 (65.21%) de estas se observaron en total 269 metafases. La media de metafases observadas fue de 17.9 (Rango: 1 – 64).

En tres de las muestras (casos 20, 27 y 28) el tejido paratiroideo creció, sin embargo no se observaron metafases para su análisis.

En 5 (17.24%) de las muestras el tejido creció en perfectas condiciones, sin embargo, a la estufa de cultivo celular le falló el termostato, subiendo la temperatura a 60° C estropeando de tal forma todos los cultivos que había en ese momento.

En 5 (17.24%) muestras el tejido paratiroideo no creció. En ningún momento observamos fibroblastos u otro tipo celular. Tres de las muestras sucedieron en los 10 primeros casos (casos 2, 7 y 10), en los que los cultivos no llevaban insulina. En las dos muestras restantes (casos 13 y 14) el medio contenía insulina como factor estimulante de crecimiento. Dichos casos corresponden a 4 pacientes con un hiperparatiroidismo primario por adenoma (casos 7, 10, 13 y 14) y a un hiperparatiroidismo secundario (caso 2); en este caso

el autotransplante funciona y mantiene cifras de PTH suficientes para una función normal.

En una muestra (caso 5) el tejido se contaminó y no fue posible salvarla a pesar de agregar más antibióticos y subcultivarla con otro tipo de medio.

Comparamos estadísticamente los resultados del cultivo de tejido paratiroideo frente a los resultados del cultivo de linfocitos; en el grupo de pacientes la diferencia estadística fue muy significativa [$p < 0.0001$]. Según nuestros cálculos estadísticos existe un 49 % de posibilidades de fracaso cuando se cultiva el tejido paratiroideo.

V.6.- Resultados citogenéticos en linfocitos

El análisis citogenético de la sangre periférica del grupo de pacientes que estudiamos mostró anormalidades cromosómicas claras en 22 (78.5%) de los pacientes, en 6 (20.6%) pacientes se consideró normal y en un paciente (3.4%) no se realizó el estudio por falta de crecimiento de los linfocitos. En total se estudiaron 1522 metafases en los linfocitos cultivados y se encontraron alteraciones cromosómicas en 328 metafases (21.55%).

En el grupo control, en total se estudiaron 725 metafases y el análisis citogenético de los linfocitos fue normal en el 100% de los casos. Se compararon estadísticamente ambos grupos y la diferencia fue muy significativa [$p < 0.0001$].

Se encontraron diversas alteraciones que afectan al cromosoma 11 en 71 linfocitos y representan el 21.64% del total de las aberraciones cromosómicas en sangre periférica, estas alteraciones fueron: pérdida total del cromosoma (caso 1; en tres células), aumento en la fragilidad (caso 3; en 30 células), pérdida de ADN en los brazos cortos "11p-" (caso 4; en 4 células), rotura en 11q24 (caso 5; en 11 células), trisomía 11 (caso 6; en una célula), rotura en los brazos largos (caso 7; en 10 células), cromosoma 11 extraño (caso 11; en 5 células) e inversión del cromosoma 11 (caso 16; en 7 células), [tabla nº 4].

El cromosoma 11 presentó alteraciones en 8 casos (28.5%), se visualizaron clones celulares claros en dos de ellos. Los casos correspondieron a cinco pacientes con un hiperparatiroidismo primario por adenoma, dos pacientes con hiperparatiroidismo secundario y uno terciario.

TABLA nº 4. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS CON AFECTACIÓN DEL CROMOSOMA 11.

CASO	DIAGNÓSTICO	Nº CÉLULAS	ALTERACIÓN
1	Adenoma	1	45, XX, -11, -18, +B
		1	45, XX, -11
		1	43, XX, -8, -10, -11
3	Adenoma	30	46, XX, Frag 11q
4	Adenoma	3	46, XX, 11p-
		1	47, XXX, 11p-, +?
5	HPTsecundario	11	46, XX, rotura 11q
6	HPTsecundario	1	47, XX, +11
7	Adenoma	10	46, XX, rotura 11q
11	HPTterciario	5	46, XY, rotura 3p13, ¿11?
16	Adenoma	7	46, XY, INV 11

Las alteraciones cromosómicas que afectaron al cromosoma 11 fueron más frecuentes en el sexo femenino (75%), frente al 25% de los varones.

Otro cromosoma en el cual se establecieron clones celulares fue el cromosoma X, en tres casos se encontró el cariotipo 47, XXX (casos 4, 14 y 21) en 4, 4 y 5 células respectivamente, también se encontró el cariotipo 45, X, -X (casos 5, 14 y 21) en 5, 3 y 3 células, respectivamente.

La monosomía del cromosoma 17 se presentó en los casos nº 2 (3 células), nº 3 (22 células) y nº 17 (5 células). En el caso Nº 3 la monosomía 17 fue acompañada de la pérdida del cromosoma 16 en las tres células, mientras que en los casos 2 y 17 la monosomía fue pura. Estos dos últimos casos, corresponden a una hiperplasia paratiroidea en hiperparatiroidismo secundario (caso 2) y en hiperparatiroidismo primario por un MEN 1 (caso 17), el otro caso corresponde a un adenoma paratiroideo.

La diploidía por defecto (hipodiploidía) o por ganancia (hiperdiploidía) estuvo presente en 137 linfocitos, este hallazgo representa el 41.76% de las anomalías cromosómicas. La hipodiploidía se encontró en 85 metafases de 7 pacientes (casos; 4, 6, 7, 8, 14, 21, y 22), en los cuales predomina el hiperparatiroidismo primario por adenoma en un 85.7%. La hiperdiploidía se visualizó en 52 metafases de 4 pacientes (casos; 5, 6, 15 y 16), dos de ellos correspondieron a un hiperparatiroidismo secundario y los otros dos a un HPTp por adenoma (tabla nº 5).

TABLA nº 5 .DIPLOIDÍAS ENCONTRADAS EN LINFOCITOS

CASO	(Nº CÉLULAS)	TIPO	CARIOTIPO	DIAGNÓSTICO
4	22	Hipodiploidía	< 46 cromosomas	Adenoma
5	33	Hiperdiploidía	> 47 cromosomas	HPTsecundario
6	22	Hipodiploidía	< 44 cromosomas	HPTsecundario
6	11	Hiperdiploidía	> 47 cromosomas	HPTsecundario
7	14	Hipodiploidía	< 40-45 cromosomas	Adenoma
8	7	Hipodiploidía	< 45 cromosomas	Adenoma
14	15	Hipodiploidía	< 44 cromosomas	Adenoma
15	3	Hiperdiploidía	> 91 cromosomas	Adenoma
16	5	Hiperdiploidía	> 92 cromosomas	Adenoma
21	2	Hipodiploidía	< 45 cromosomas	Adenoma
22	3	Hipodiploidía	< 44 cromosomas	Adenoma

La rotura cromosómica y pérdida de fragmentos (deleción) fue un hecho que se encontró en 14 (50%) pacientes; representan el 28.9% (N = 95) del total de las alteraciones cromosómicas. Predominaron los pacientes con un adenoma paratiroideo en un 64.28% (tabla nº 6).

TABLA Nº 6. DELECCIONES EN LINFOCITOS

CASO	DIAGNÓSTICO	Nº L.	CARIOTIPO
2	HPTsecundario	1	44, XY, 3p-, -7, -20
4	Adenoma	3	46, XX, 11p-
		1	47, XXX, 11p-, ¿+?
5	HPTsecundario	11	46, XX, 11q roto
7	Adenoma	10	46, XX, 11q roto
		1	46, XX, 2q-
8	Adenoma	5	46, XXq13 roto
		2	46, XX, -20, +P, 4q roto
9	HPTterciario	1	46, XX, +13, -12, 4p-
		1	46, XX, 3q13 roto
10	Adenoma	20	46, XYq+, 9mo, 21s+, [3q11, 5q14, 5q34, 10q22, 1p36 rotos]
11	HPTterciario	5	46, XY, 3p13 roto, ¿11?
13	Adenoma	2	46, XX, 1p y 7q22 rotos
16	Adenoma	2	46, XYq+, 9qh+, 15s+, [Xq, 2q25, 20qh rotos]
17	MEN I	5	46, XX, 5q23-31 roto
18	Adenoma	3	46, XX, 22s+, [5q15, 9q13, 1ph rotos]
22	Adenoma	5	46, XYq+, [1qh, 5qh, 1p32, 2q35, 4p13, rotos]
24	Adenoma	17	46, XX, 21s+, 12q-

V.7.- Resultados citogenéticos del tejido

Se analizaron 269 metafases del tejido paratiroideo de 15 pacientes y 105 metafases (39%) presentaron anomalías cromosómicas, los hallazgos citogenéticos fueron diversas aberraciones cromosómicas que comentaremos a continuación.

El grupo de los 15 pacientes en los que fue posible el análisis citogenético lo componen: 8 hiperparatiroidismos primarios por adenoma, 4 hiperparatiroidismos secundarios, 2 hiperparatiroidismos terciarios y un MEN 1.

Se encontró la pérdida del cromosoma 11 en 3 casos; este hallazgo representa el 18% de las anomalías cromosómicas. Dicha alteración es importante, dado que fueron clones celulares en los tres casos (tabla nº 7). En el caso Nº 4 se encontró pérdida de ADN en los brazos cortos del cromosoma 11.

TABLA Nº 7. ALTERACIONES CROMOSÓMICAS EN TEJIDO PARATIROIDEO CON AFECTACIÓN DEL CROMOSOMA 11

CASO	Nº CÉLULAS	ALTERACIÓN	DIAGNÓSTICO
1	3	46, XX, +D, +G, -11, -17	Adenoma
4	1	46, XX, 11p+, ¿17?	Adenoma
16	6	45, XY, -11	Adenoma
17	10	45, XX, -11	Hiperplasia (MEN 1)

Se encontraron diversas diploidías en el tejido paratiroideo en 8 (53.3%) pacientes, representan el 67.6% de las alteraciones cromosómicas (tabla nº 8). La hipodiploidía fue más frecuente (63.3%) que la hiperdiploidía (36.6%). No hubo diferencia en el tipo de hiperparatiroidismo y la presencia de diploidías. En tres pacientes (casos 6, 11 y 16) se presentaron los dos tipos de diploidías.

TABLA nº 8. DIPLOIDÍAS EN TEJIDO PARATIROIDEO

CASO	Nº CÉLULAS	TIPO	CARIOTIPO	DIAGNÓSTICO
6	11	Hipodiploidía	< 46 cromosomas	HPTsecundario
6	2	Hiperdiploidía	> 69 cromosomas	HPTsecundario
11	7	Hipodiploidía	< 46 cromosomas	HPTterciario
11	9	Hiperdiploidía	> 46 cromosomas	HPTterciario
12	5	Hipodiploidía	< 46 cromosomas	HPTsecundario
16	6	Hipodiploidía	< 46 cromosomas	Adenoma
16	3	Hiperdiploidía	> 92 cromosomas	Adenoma
17	2	Hiperdiploidía	> 46 cromosomas	MEN I
24	1	Hipodiploidía	< 44 cromosomas	Adenoma
26	15	Hipodiploidía	< 46 cromosomas	Adenoma
29	10	Hiperdiploidía	> 46 cromosomas	HPTsecundario

Un paciente, diagnosticado de hiperparatiroidismo secundario (caso 6), presentó los dos tipos de diploidías en ambos cultivos: hipodiploidía en 22 e hiperdiploidía en 11 linfocitos y en el tejido paratiroideo se encontraron 11 metafases con hipodiploidía y 2 metafases con hiperdiploidía.

TABLA nº 9. ANOMALÍAS CROMOSÓMICAS EN LINFOCITOS Y TEJIDO

PARATIROIDEO QUE AFECTAN AL MISMO CROMOSOMA

CASO	(n) LINFOCITOS	(n) TEJIDO
1	1 45, XX, -11, -18, +B	3 46, XX, +D, +G, -11, -17
	1 45, XX, -11	
	1 43, XX, -8, -10, -11	
16	7 46, XY, INV 11	6 45, XY, -11
18	3 45, XX, -12	3 45, XX, -12

La tabla nº 9 muestra los tres casos en los cuales estuvo implicado el mismo cromosoma, tanto en la sangre periférica como en el tejido paratiroideo. En dos de los casos participa el cromosoma 11. En los casos 16 y 18 los hallazgos fueron clones celulares en las dos muestras celulares y en el caso N° 18 la alteración cromosómica fue idéntica (45, XX, -12).

No encontramos relación estadística entre las alteraciones cromosómicas y las cifras de calcio y PTH preoperatorios, ni en los linfocitos ni en el tejido paratiroideo. Tampoco hemos encontrado relación entre dichas aberraciones cromosómicas y la evolución de las cifras de calcio y PTH en los meses de seguimiento.

En una paciente (caso 15), el adenoma paratiroideo se acompañaba con un carcinoma de mama metacronico. En el cariotipo se encontró un clon celular; 45, XX, -3 en tres leucocitos y una hiperdiploidía > 91 cromosomas en tres leucocitos.

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

La hipercalcemia puede ser la manifestación de una enfermedad grave, como los tumores malignos [Gálvez 1995¹⁴²], o puede detectarse de forma casual en un análisis de laboratorio en pacientes y sin síntomas evidentes [Harrison 1991¹⁸¹]. Su tratamiento plantea un problema muy especial en los pacientes asintomáticos, ya que en los últimos veinte años ha aumentado el diagnóstico de la hipercalcemia asintomática [Heath¹⁸²].

Las causas de hipercalcemia son múltiples, pero el hiperparatiroidismo y el cáncer explican el 90% de los casos [Palmér 1988¹²⁵].

Antes de iniciar el estudio de una hipercalcemia, hay que asegurarse de que se trata de una hipercalcemia verdadera y no de un resultado de laboratorio falso positivo. La hipercalcemia es un problema crónico, por lo que vale la pena obtener varias muestras de calcio sérico, que no necesariamente se deben extraer en ayunas. Las pruebas falsamente positivas de hipercalcemia suelen deberse a la hemoconcentración inadvertida de la sangre durante la extracción o a la elevación de las proteínas séricas, sobre todo de la albúmina [Stenström 1974¹²⁸].

Las manifestaciones clínicas facilitan el diagnóstico diferencial. La hipercalcemia del adulto asintomático suele deberse a un hiperparatiroidismo primario [Cruz Vigo 1991¹²¹]. Sin embargo, la mayor parte de las hipercalcemias asociadas a enfermedades malignas no suelen ser asintomáticas, sino que son los síntomas de la enfermedad maligna los que llevan al paciente a consultar al médico; la hipercalcemia se descubre luego, durante el estudio.

VI.1.- Del grupo de pacientes

En nuestro estudio presentamos los casos clínicos de 18 pacientes afectados con hiperparatiroidismo primario (HPTp), de los cuales 4 (13.8%) presentaban una hipercalcemia asintomática. El resto del grupo se compone de 7 pacientes afectados de hiperparatiroidismo secundario, 3 de hiperparatiroidismo terciario y un paciente con un MEN 1.

La respuesta a la pregunta formulada en la literatura, ¿Teinen los pacientes con HPTp asintomático enfermedad menos severa (glándulas menos grandes y menos alteraciones bioquímicas) que aquellos con síntomas?, sigue siendo, hoy en día, motivo de controversia.

En una serie de 111 pacientes con HPTp tratados quirúrgicamente por Harrison y Cols.¹⁸¹ (1991), se comparó al grupo de pacientes asintomáticos 28 (25.2%) con el grupo sintomático 83 (74.7%). No se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en cuanto a edad, calcio sérico, molécula intacta de la PTH y peso de las glándulas resecadas (adenomas).

La prevalencia de la enfermedad paratiroidea asintomática es difícil de determinar, dado que existe una gran variación en la interpretación de los síntomas y su asociación con el hiperparatiroidismo, por lo tanto la historia natural del hiperparatiroidismo asintomático sigue siendo desconocida.

En nuestro grupo de pacientes predominó el sexo femenino (72.4%) frente al masculino (27.6%), [$p < 0.001$], este predominio del sexo femenino es similar en todas las series [Melton 1990¹²⁹].

Los valores medios de calcio sérico preoperatorio, en el grupo de pacientes, en general, fueron de 11.6 (R: 10.3 – 14.7) mg/dl. No existió diferencia estadística alguna al comparar los valores de Ca preoperatorio del grupo de HPT primario [11.64 mg/dl] vs HPT renal (HPT_r) [11.68 mg/dl].

A las 24 horas de la cirugía paratiroidea los valores medios del calcio sérico fueron de 7.67 mg/dl para el HPT_p y de 8.42 mg/dl para el HPT_r, existiendo estadísticamente una diferencia significativa [$p < 0.0001$] con respecto al Ca preoperatorio. No existe diferencia estadística comparando ambos grupos. Los pacientes con un HPT_r reciben aporte de gluconato cálcico por vía parenteral y vitamina D en el preoperatorio inmediato razón por la cual las cifras de Ca sérico son ligeramente más elevadas.

Las cifras de Ca se mantienen dentro de la normalidad; 9.06 mg/dl para el HPT_p y 9.22 mg/dl para el HPT_r, durante una media de seguimiento de 14 meses (R: 4 – 37 meses) para el grupo en general. Esta normalidad de los valores de Ca se mantienen con una diferencia estadística muy significativos [$p < 0.0001$] respecto a los valores preoperatorios en ambos grupos, sin embargo sigue sin existir diferencia estadística comparando ambos grupos.

Los valores medios preoperatorios de la molécula intacta de la hormona paratiroidea (PTH_{mi}), en el grupo en general, fueron de 364.3 (R: 72.5 – 1533) pg/ml. Los valores medios preoperatorios de la PTH_{mi} en el HPT_p fueron de 264.3 pg/ml y de 565 pg/ml para el HPT_r. Comparamos estadísticamente dichos valores de la PTH_{mi} en ambos grupos y fue significativa [$p < 0.0001$].

Los pacientes con un HPTp por adenoma presentaron una caída de la PTHmi muy importante (21.4 pg/ml) a los 30 minutos de su exéresis, que estadísticamente fue significativa [$p < 0.0001$] con respecto a las cifras medias preoperatorias, esta diferencia se mantiene durante los meses de seguimiento.

La PTHmi fue indetectable a los 30 minutos de la paratiroidectomía total en los pacientes con un hiperparatiroidismo por hiperplasia, situación que se mantiene hasta aproximadamente unos 2.8 meses de la Cirugía, estos resultados son estadísticamente significativos [$p < 0.0001$] con respecto al los valores preoperatorios.

Basándose en los datos anteriormente descritos, podemos aseverar que la cirugía paratiroidea ofrece una corrección de la hipercalcemia a las 24 Hrs de la exéresis del adenoma o de las glándulas hiperplásicas, así como de las cifras de la PTHmi, a los 30 minutos de la intervención. Dichos datos dan apoyo también a una política liberal de la indicación de exploración cervical en pacientes con hiperparatiroidismo y cuestiona la política de observación sin intervención quirúrgica.

Los datos clínicos con los que se presentó el grupo de pacientes en general fueron:

- a). Síntomas renales en un 51.7% (N = 15), de los cuales predominaron los cólicos renoureterales (80%) y la poliuria (4 pacientes).
- b). Síntomas osteoarticulares en 19 pacientes (65.5%), predominó el dolor en el 100% de los casos y tres pacientes presentaron deformidad ósea.
- c). Síntomas psiquiátricos en 2 pacientes (6.9%) que presentaban un cuadro depresivo.

- d). Hipertensión arterial se detectó en 17 pacientes (58.6%), todos ellos recibían medicación.
- e). En 13 pacientes (44.8%) se detectó litiasis renoureteral con pruebas de imagen; el 90% de los mismos necesitó tratamiento con litotricia. Dos de los pacientes presentaron nefrocalcinosis que precisó tratamiento quirúrgico.
- f). En la radiografía ósea se detectó osteoporosis en 15 pacientes (51.7%) y sólo un paciente presentó osteítis fibrosa quística.
- g). Un paciente presentó calcifilaxis.

VI.2.- DE LA INTERVENCIÓN.

La intervención se realizó bajo anestesia general. Se tuvieron en cuenta los problemas anestésicos que pueden plantear este tipo de pacientes, tales como alteraciones iónicas, grado de afectación de su función renal y todos los problemas médicos que esto conlleva.

La exploración cervical se realizó a través de una cervicotomía transversa, buscando las cuatro glándulas paratiroides y siguiendo los principios generales para este tipo de cirugía. Estos principios nacen con Oliver Cope, que resume los estudios de su maestro, el Dr. Churchill, con el que había intervenido a los primeros enfermos con hiperparatiroidismo, y años después, los expone en su artículo "*Historia del hiperparatiroidismo*" [Cope 1966¹⁸³]. San Román (1991¹⁸⁴), reafirma lo ya publicado por Cope, la primera cualidad para realizar una cirugía paratiroidea es la "*paciencia*" del Cirujano, y enfatiza que la prisa está contraindicada en casi toda la cirugía, pero en estos enfermos lo está de una manera absoluta. Es necesario que el cirujano se convenza de que puede ser una intervención larga en la que lo que más nos va a costar, no es encontrar una

glándula aumentada de tamaño, sino la identificación de las 4 glándulas para decidir lo que deberemos extirpar. Después habrá que esperar el diagnóstico de la biopsia intraoperatoria.

En 1934 Churchill y cols¹⁸⁵ publicaron que el éxito de la Cirugía paratiroidea tiene que obtenerse al "*primer intento*". Las razones están en relación con las dificultades y posibles complicaciones de una reintervención para buscar una glándula patológica no extirpada en la primera operación [San Roman 1979¹⁸⁶].

Así como en la primera intervención la mayoría de los autores coinciden en que no hay necesidad de emplear medios de localización previos a la misma, en las reintervenciones todos están de acuerdo en utilizarlos al máximo [Carty 1991¹⁸⁷].

Los medios de localización deben ser lo suficientemente precisos para evitar los falsos positivos. Los medios no invasivos de que se dispone son: la ecografía, la gammagrafía por sustracción con talio-technecio, la tomografía axial computarizada y la resonancia nuclear magnética. Los medios invasivos consisten fundamentalmente en el cateterismo venoso selectivo y la arteriografía convencional y digital.

Está bien establecido que las complicaciones quirúrgicas en estas intervenciones se multiplican en cada reintervención.

El tercer consejo de Cope es la "*hemostasia cuidadosa*", la identificación de las glándulas paratiroideas normales entre la grasa cervical normal se dificulta al teñirse con sangre, en caso de hemorragia.

El resto de los consejos de Cope son; "*suturas de tracción, material quirúrgico fino y adecuado, cirujanos con experiencia y por último un*

anatomopatólogo con experiencia". Si difícil es la identificación del tejido paratiroideo para su extirpación, mucho más difícil es la diferenciación, y a veces imposible la distinción, en un corte por congelación, entre un adenoma, una hiperplasia y una glándula normal [Esselstyn 1977¹⁸⁸].

VI.3.- Del cultivo de linfocitos

El crecimiento celular del cultivo "*in vitro*" de linfocitos en sangre periférica del grupo de pacientes fue satisfactorio en 27 (93.1%) de ellos. En una muestra (caso 9; hiperparatiroidismo terciario) los linfocitos no crecieron y en otra paciente solo fue posible analizar 7 linfocitos (caso 29; hiperparatiroidismo secundario), esta falta y escasez de crecimiento fue considerada como actitud extraña, dado que los leucocitos son considerados como la mejor célula para el análisis citogenético, por la facilidad de obtener la muestra y por su rápido crecimiento. Ambos casos en los que los leucocitos no crecieron correctamente, corresponden a un hiperparatiroidismo renal; estos pacientes son ingresados en el Servicio de Nefrología para control preoperatorio de las anomalías de los iones Ca, P y Mg, sesión de diálisis en la víspera de la intervención, control de la hipertensión arterial y control de fármacos inmunosupresores en el caso de transplantados renales. Suponemos que todas estas medidas y fármacos pudieron ser los responsables de la falta de crecimiento de los linfocitos en el cultivo.

La buena calidad de las metafases en los linfocitos cultivados nos permitió analizar un número adecuado de ellas. En total estudiamos 1522 metafases del grupo de pacientes y encontramos 328 (21.55%) patológicas.

En el grupo control crecieron todos los cultivos de linfocitos, las metafases obtenidas fueron de buena calidad y permitieron analizar el número de ellas propuesto. Se estudiaron 725 metafases y todas fueron consideradas normales.

Con los resultados obtenidos del cultivo de linfocitos reafirmamos la facilidad con la que crecen estas células y el corto tiempo en que se logra observar metafases. En el hiperparatiroidismo obtuvimos un 93.10% de posibilidades de realizar un cariotipo y en el grupo control (adultos sanos) fue del 100%.

VI.4.- Del cultivo de tejido paratiroideo

En el cultivo "*in vitro*" de tejido paratiroideo los fibroblastos aparecieron a los 6.6 días y se observaron colonias celulares 7 días más tarde. El tiempo medio requerido para visualizar una metafase fue de 91.9 días (Rango: 3 – 254 días).

En total cultivamos 29 muestras de tejido paratiroideo de las cuales, en 23 (79.31%) el tejido paratiroideo creció, pero sólo 15 (65.21%) fueron de calidad suficiente para observar metafases. En total pudimos estudiar 269 metafases. La media de metafases observadas en los 15 casos fue de 17.9 (Rango: 1 – 64).

En tres de las muestras (casos 20, 27 y 28) en que creció el tejido paratiroideo, no fue posible observar metafases para su estudio. En 5 (17.24%) de las muestras el tejido creció en perfectas condiciones, sin embargo la estufa de cultivo celular tuvo un fallo en el termostato que subió la temperatura a 60° C, estropeando de tal forma todos los cultivos que contenía en ese momento.

En las 5 (17.24%) muestras de tejido paratiroideo que no creció, en ningún

momento observamos fibroblastos u otro dato que indicara viabilidad. Tres de ellas corresponden a los 10 primeros pacientes estudiados (casos 2, 7 y 10), en las que los cultivos no llevaban insulina. En las dos muestras restantes (casos 13 y 14) el medio contenía insulina como factor estimulante de crecimiento. Con este resultado podemos decir que la insulina juega un importante papel como factor de crecimiento en el cultivo de tejido paratiroideo. Los cinco casos referidos corresponden a 4 pacientes con hiperparatiroidismo primario por adenoma (casos 7, 10, 13 y 14) y a un hiperparatiroidismo secundario (caso 2), en este caso el autotransplante funciona y mantiene cifras de PTH suficientes para una función normal.

En una muestra (caso 5) el tejido paratiroideo se contaminó y no fue posible salvarlo a pesar de cambiar y aumentar la dosis del antibiótico y subcultivarlo con otro tipo de medio. Con estos resultados, en cuanto al cultivo *in vitro* de tejido paratiroideo, podemos decir que dicho tejido es muy caprichoso en su crecimiento y que requiere un especial cuidado, con un largo tiempo de cultivo, para poder analizar citogenéticamente sus células.

Comparamos estadísticamente los resultados del crecimiento del cultivo de tejido paratiroideo frente a los resultados del crecimiento de linfocitos; en el grupo de pacientes la diferencia estadística fue muy significativa [$p < 0.0001$], existiendo un 49 % de probabilidades de fracasar cuando se cultiva "*in vitro*" el tejido paratiroideo.

VI.5.- De los mecanismos moleculares de la enfermedad paratiroidea

Se pensaba, hace algunos años, que las neoplasias benignas eran monoclonales y en los adenomas paratiroideos se han logrado pruebas genéticas directas de esta monoclonalidad. La monoclonalidad implica un origen a partir de una célula anormal, que pierde el control del crecimiento pero que sigue siendo funcional, incluso aunque su función sea también anormal; la consecuencia es una masa glandular anormal, un adenoma. También se pensaba que la hiperplasia de células principales era policlonal, de forma que todas las células paratiroideas se hacían anormales en respuesta a un estímulo extrínseco [Friedman 1990⁵⁷].

El locus genético del cromosoma 11, responsable del síndrome familiar de hiperplasia paratiroidea y de los tumores pancreáticos e hipofisiarios asociados, es decir, del síndrome de neoplasia endócrina múltiple tipo I, parece funcionar normalmente como un oncogén [Arnold 1994⁵¹]. Estos genes, identificados en el retinoblastoma y en otros síndromes cancerosos hereditarios, parecen controlar el crecimiento celular en situaciones normales; la pérdida de ambos alelos se traduce en un crecimiento anormal [Larsson 1988⁶⁰]. En estos síndromes suele faltar un gen de la línea germinal, una segunda mutación o la pérdida de la porción del cromosoma donde se encuentra el alelo normal en una sola célula, da lugar a su expansión monoclonal.

En la mujer, los estudios en los que se han utilizado marcadores del cromosoma X que sufren inactivaciones aleatorias permiten realizar pruebas de monoclonalidad frente a policlonalidad en tumores paratiroideos extirpados e indican que muchos adenomas son monoclonales [Arnold 1992⁵⁹]. En otros pacientes, las pruebas son insuficientes y no permiten establecer conclusiones

sobre la clonalidad.

Otras investigaciones han arrojado nueva luz sobre los posibles mecanismos del crecimiento celular anormal. La síntesis de hormona paratiroidea se encuentra bajo el control de un promotor que ha evolucionado hasta dirigir elevadas tasas de transcripción del gen de la hormona en las células paratiroideas. En una translocación recíproca que afecta al cromosoma 11, el promotor PTH dirige una expresión excesiva de un producto del gen denominado PRAD-1 [Arnold 1994⁵¹]. El producto del gen es D-ciclina, una proteína que desempeña un papel esencial en la regulación de la división celular normal y que se expresa en demasía (o sufre una mutación) y contribuye a que la velocidad de la replicación celular se altere, hecho que constituye una de las características del fenotipo neoplásico [Yoshimoto 1991⁵²].

El aumento de tamaño de las paratiroides en las hiperplasias y en el MEN I se debe, probablemente, a una expansión monoclonal, siendo por tanto, similar a los adenomas [Beckers 1994¹⁸⁴].

De los análisis del tumor y de la detección genética de las familias con polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción informativa puede deducirse la pérdida de ambas copias de un gen MEN I funcional. Sólo se conserva el alelo anormal; el presunto alelo normal procedente del padre no afectado se pierde en las células tumorales pero no en las normales. Por tanto, el tumor no tiene una copia funcional del gen MEN I, que supuestamente es el que controla el crecimiento [Thakker 1989¹⁸⁷]. Es interesante señalar que, en el análisis cromosómico de algunos adenomas esporádicos, es posible detectar la pérdida de al menos una copia del gen MEN I; no se sabe si existe un déficit en ambas copias (por una mutación en el segundo alelo). Tampoco se sabe si la

hiperplasia hereditaria de células principales comienza característicamente con una expansión policlonal.

VI.6.– Del análisis citogenético de los linfocitos

El análisis cromosómico de linfocitos cultivados en la sangre periférica del grupo de pacientes que estudiamos mostró anormalidades cromosómicas claras en 22 (78.5%) casos; estas anormalidades fueron aberraciones del tipo cromático, roturas de diferentes cromosomas, trisomías y diploidías. En total, se estudiaron 1522 metafases en linfocitos y se encontraron alteraciones en 328 (21.55%) metafases.

Se encontraron diversas alteraciones que afectan al cromosoma 11 en 71 linfocitos y representan el 21.64% del total de las aberraciones cromosómicas en sangre periférica, estas alteraciones fueron: pérdida total del cromosoma (caso 1; en tres células), aumento en la fragilidad (caso 3; en 30 células), pérdida de ADN en los brazos cortos "11p–" (caso 4; en 4 células), rotura en 11q24 (caso 5; en 11 células), trisomía 11 (caso 6; en una célula), rotura en los brazos largos (caso 7; en 10 células), cromosoma 11 extraño (caso 11; en 5 células) e inversión del cromosoma 11 (caso 16; en 7 células).

Se establecieron clones celulares del cromosoma X, se encontró el cariotipo 47, XXX en tres pacientes (casos 4, 14 y 21) en 4, 4 y 5 células respectivamente. Los tres casos con trisomía "X" corresponden a pacientes con un hiperparatiroidismo primario por adenoma, y representan el 17.6% del total de los pacientes con adenoma paratiroideo de la serie.

La presencia de cromosomas adicionales es un hallazgo muy común entre las anormalidades genéticas en las neoplasias humanas [Hecht 1995¹⁸⁹]. De acuerdo con la opinión actual, las trisomías son el resultado de una enfermedad relacionada con la falta de separación mitótica.

La trisomía del cromosoma "X" es la anormalidad numérica más comunmente comunicada, dicha alteración cromosómica es encontrada predominantemente en pacientes con linfoma no Hodgkin [Younes 1995¹⁹⁰]. Los autores refieren que las alteraciones cromosómicas numéricas del cromosoma "X" juegan un papel muy importante en la patogénesis de estos linfomas no Hodgkin.

No existe actualmente ninguna comunicación con respecto a trisomías del cromosoma "X" e hiperparatiroidismo.

Se encontró el cariotipo 45, X, -X (casos 5, 14 y 21) en 5, 3 y 3 células respectivamente, dicha monosomía "X" fue clon celular en todos los casos. Dos de los pacientes (casos 14 y 21) corresponden a un adenoma paratiroideo y el caso N° 5 a una paciente con un hiperparatiroidismo secundario.

La pérdida del cromosoma "Y" se encontró en dos pacientes (casos 16 y 22) con un hiperparatiroidismo primario por adenoma, el caso N° 16 presenta la monosomía "Y" en 10 células (clon) y el caso N° 22 en una célula.

El significado de la pérdida de cromosomas sexuales en el cariotipo de linfocitos es una alteración que todavía no ha sido claramente explicada ni establecida [Riske 1994¹⁹¹].

Existen estudios que mantienen la teoría de que la pérdida del cromosoma "Y" es un hecho no fenotípico asociado con el proceso madurativo en varones [Pierre 1971¹⁹²].

La pregunta formulada sería: ¿Existe una eventualidad neoplásica primaria que precipite la pérdida de los cromosomas sexuales "Y" o "X"? Las teorías relacionadas con el significado de la pérdida del cromosoma "Y" incluyen que dicho cromosoma contiene un gen supresor tumoral que cuando se pierde o modifica permite una proliferación anormal, como expresión de un gen anormal, supuestamente localizado en el cromosoma "X" [Logan 1990¹⁹³]. La pérdida del cromosoma "Y", y consecuentemente del gen supresor tumoral como proceso de envejecimiento normal, puede predisponer a estos sujetos a un hecho neoplásico [Powell 1990¹⁹⁴].

Riske¹⁹¹ (1994) y colaboradores presentan un estudio citogenético en 9300 muestras de médula ósea y sangre periférica de pacientes con enfermedad hematológica, encuentran 240 pacientes (2.5%) con la pérdida de un cromosoma sexual ("X" o "Y"). El autor refiere que la pérdida de un cromosoma sexual podría explicar la génesis de los pacientes con leucemia, sin embargo, el significado de dichas pérdidas sigue sin explicación. No tenemos referencias bibliográficas de la pérdida de cromosomas sexuales e hiperparatiroidismo, por lo que nos permitimos apoyar las teorías propuestas por Powell (1990¹⁹⁴).

La monosomía del cromosoma 17 fue encontrada en los casos; 2 (3 células), 3 (22 células) y 17 (5 células). En el caso N° 3 la monosomía 17 fue acompañada de la pérdida del cromosoma 16 en las tres células, mientras que en los casos 2 y 17 la monosomía fue pura. Estos dos últimos casos son pacientes con una hiperplasia paratiroidea por hiperparatiroidismo secundario (caso 2) e hiperparatiroidismo por un MEN 1 (caso 17) respectivamente, el otro caso corresponde a un adenoma paratiroideo.

La diploidía por defecto (hipodiploidía) o por ganancia (hiperdiploidía) estuvo presente en 137 linfocitos, este hallazgo representa el 41.76% de las anomalías cromosómicas. La hipodiploidía se encontró en 85 metafases de 7 pacientes (casos; 4, 6, 7, 8, 14, 21, y 22), de los cuales predomina el hiperparatiroidismo primario por adenoma en un 85.7%. La hiperdiploidía se visualizó en 52 metafases de 4 pacientes (casos; 5, 6, 15 y 16), dos de ellos correspondieron a un hiperparatiroidismo secundario y los otros dos a un HPTp por adenoma.

Las diploidías no son un hallazgo común en linfocitos, se han publicado solo 40 artículos sobre hiperdiploidías encontradas en el cultivo de médula ósea de pacientes con leucemia linfoblástica en niños [Kwong 1995¹⁹⁵].

La hiperdiploidía refleja un aumento del contenido de ADN en las células. Se han propuesto varios mecanismos para la formación de células hiperdiploides, esto incluye una ganancia simultánea de cromosomas a partir de un cariotipo diploide durante una sola división celular anormal o durante la duplicación de clones hipodiploides o por la pérdida de cariotipos diploides más altos [Onodera 1992¹⁹⁶].

Sería interesante definir los mecanismos que relacionan el hiperparatiroidismo a un estado hipo e hiperdiploide, dado que ésta alteración cromosómica coincide con los hallazgos en el tejido paratiroideo.

La rotura cromosómica y pérdida de fragmentos (deleción) fue un hecho que se encontró en 14 (50%) pacientes, este hallazgo representa el 28.9% (N = 95) del total de las alteraciones cromosómicas. Predominaron los pacientes con un adenoma paratiroideo en un 46%.

La presencia de fragilidad cromosómica es indudable pensar que invita a las traslocaciones y a la recombinación cromosómica. La expresión de sitios frágiles se obtiene con el empobrecimiento de la concentración de ácido fólico y timidina en el medio de cultivo de linfocitos.

En la literatura se han descrito sitios frágiles heredables en bandas específicas de cromosomas, tales como: Xq27, 2q11, 9p13, 10q23, 10q25, 11q13, 12q13, 16p12, 16q22, 17p12, 20p11. Los sitios frágiles 16q22, 17p12 y 20p11 coinciden con los puntos de roturas implicados en reordenaciones estructurales de algunas neoplasias [Scriber 1994¹⁷].

Una gran variedad de roturas constitucionales y aberturas se han encontrado en la población general. Los cromosomas más afectados son: 1q44, 2q23, 3p14, 6q26, 7q31, 9q13, y 13q34. Se han encontrado deleciones posiblemente relacionadas con la carcinogénesis química y que tienen un punto de rotura en una localización similar a un sitio frágil constitucional. Por ejemplo la banda 3p14 se ha descrito como un punto de rotura de la deleción 3(p14p23) del carcinoma de células pequeñas de pulmón, un carcinoma fuertemente asociado a fumadores [Weatherall 1991¹⁸].

Estos hallazgos son interesantes ya que sugieren que los sitios frágiles pueden actuar como factores de predisposición para ciertas reordenaciones cromosómicas en neoplasias humanas y algunos de ellos pueden representar sitios oncogénicos. Los oncogenes no son únicamente los genes involucrados en la carcinogénesis. Algunos defectos cromosómicos primarios en procesos tumorales no incluyen ningún oncogén conocido (ejemplo; cambios numéricos como +8, -7).

Una categoría de genes involucrados en la carcinogénesis son los oncogenes que juegan un importante papel en el control de la proliferación celular y su actividad está normalmente limitada a ciertos estadios del desarrollo o a funciones específicas en la diferenciación celular. Sin embargo, estos oncogenes pueden desregularse como resultado de una reordenación o mutación puntual o por una amplificación. Los oncogenes activados aparecen generalmente de forma dominante, tenemos ejemplos como el tumor de Wilms o el retinoblastoma y el carcinoma de pulmón, mama e intestino grueso en los que se necesita la pérdida de ambos alelos para que se desarrollen [Scriver 1994¹⁷].

La presencia de aberraciones y roturas cromosómicas en el hiperparatiroidismo sugieren una inestabilidad genética. El significado de éstos hallazgos citogenéticos son hoy en día inexplicables, sin embargo se han relacionado con un alto porcentaje de aparición de cánceres futuros en sujetos aparentemente sanos.

Gustavsen¹⁹⁷ en 1983 publicó por primera vez el artículo "*Chromosomal breakage in multiple endocrine adenomatosis (Types I and II)*". En su trabajo manifiesta la inestabilidad cromosómica que existe en este síndrome. En 1988, Benson¹⁹⁸ comunica el incremento de roturas cromosómicas en linfocitos de algunos pacientes con un MEN 1 y compara estos hallazgos con un grupo control. Scappaticci¹⁹⁹ (1991) y Tomassetti²⁰⁰ (1995) confirman los hallazgos citogenéticos postulados por Gustavsen¹⁹⁷ en 1983.

Existe una gran confusión en el momento de interpretar el significado de los hallazgos cromosómicos en el MEN 1, dado que el comportamiento clínico de

este síndrome es más leve en comparación con otros síndromes endócrinos múltiples (MEN II-a y MENII-b), donde también existe el llamado "*síndrome del cromosoma frágil*" [Hecht 1991²⁰¹].

El término síndrome del cromosoma frágil ha sido aplicado a un número de enfermedades como la anemia de Fanconi, el síndrome de Bloon, la ataxia telangiectasia y el xeroderma pigmentoso; todas estas patologías tienen una común tendencia al desarrollo de malignidad y una especial predisposición a la rotura cromosómica espontánea en el cultivo celular, particularmente en los linfocitos de la sangre periférica [Sutherland 1979²⁰²].

El síndrome endócrino múltiple tipo I rompe el prototipo del clásico síndrome de inestabilidad cromosómica: es autosómico, el locus genético se localiza en el cromosoma 11, específicamente en la banda 11q13. Sin embargo, no es un desorden recesivo. El MEN 1 es de carácter dominante con un alto grado de penetrancia [Hecht 1991²⁰¹].

PROPIEDADES DEL SÍNDROME DE INESTABILIDAD CROMOSÓMICA:

- 1º. Inestabilidad cromosómica: los cromosomas inestables podrán ser evidenciados espontáneamente o por inducción a nivel citogenético o a nivel molecular.
- 2º. Genético: los síndromes son hereditarios, pudiendo ser autosómico, dominante o recesivo, probablemente ligados al gonosoma X y posiblemente poligénicos.
- 3º. Frecuencia: el síndrome puede ser raro o común.
- 4º. Neoplasia: el síndrome de inestabilidad cromosómica predispone a

neoplasias, pero no siempre malignas.

5º. Tipo de neoplasias: las neoplasias son variadas.

La evaluación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos cultivados de sangre periférica es un ensayo citogenético sensible para detectar la exposición a mutágenos y carcinógenos. Su validez se confirma por los estudios biomonitorizados, que se llevaron a cabo en poblaciones expuestas a agentes genotóxicos [Ashby 1985²⁰³]. Existe un consenso general sobre la necesidad de prevenir (o por lo menos reducir) las exposiciones ambientales que causan un aumento de aberraciones cromosómicas, aun cuando el efecto a largo plazo es todavía incierto. A pesar de la evidencia de que los reajustes cromosómicos específicos son factores etiológicos para algunas formas de neoplasias [Solomon 1991²⁰⁴]. La relación causal entre daño cromosómico y riesgo de cáncer permanece como una gran expeculación teórica [Sorsa 1992²⁰⁵]. Un estudio epidemiológico, efectuado en sujetos seleccionados para detección de daño citogenético en Países Norte-Europeos, muestra un aumento significativo de la incidencia de cánceres en aquellos sujetos que presentaron un alto porcentaje de aberraciones cromosómicas, aunque no evaluaron los sitios específicos del cáncer y otros factores predisponentes tales como el fumar y la situación laboral [Hagmar 1994²⁰⁶].

Se ha realizado un estudio en Italia [Bonassi 1995²⁰⁷] en un grupo de 1455 sujetos, se inicia en 1960 y se evalúa el riesgo de presentar un carcinoma asociado con el daño citogenético (aberraciones cromosómicas). Encontraron un incremento estadístico significativo de mortalidad para todos los cánceres encontrados en los sujetos con un medio y alto nivel de aberraciones

cromosómicas en linfocitos de sangre periférica. Los autores italianos reafirman con su estudio la existencia de una asociación entre la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos y la aparición de un futuro cáncer. En este estudio encontraron una gran correlación entre el nivel de aberraciones cromosómicas y riesgo principalmente de neoplasias hematológicas, dichas neoplasias pueden sugerir una especificación del tejido para las aberraciones cromosómicas como un biomarcador predecible.

En el grupo control, se estudiaron 725 metafases y el análisis citogenético de los linfocitos se considero normal en el 100% de los casos. Se efectuó un análisis estadístico comparando el resultado del grupo control (0% de metafases patológicas) frente al grupo de pacientes (328 linfocitos patológicos), el resultado estadístico de dicha comparación fue muy significativo [$p < 0.0001$]. Este resultado estadístico es similar si comparamos el número de pacientes con un estudio citogenético anormal ($N = 22$) frente al grupo control ($N = 0$), [$p < 0.0001$].

Con los resultados citogenéticos en linfocitos de los pacientes y con la comparación estadística de los resultados citogenéticos del grupo control (voluntarios sanos), podemos suponer que los pacientes con una enfermedad hiperparatiroidea presentan una gran variedad de alteraciones cromosómicas difíciles de interpretar y que dichas aberraciones podrían ser compatibles con el síndrome del cromosoma frágil, sin embargo creemos que es necesario un grupo mayor de pacientes y que requieren un seguimiento más amplio con la finalidad de observar si estos pacientes con un alto porcentaje de aberraciones cromosómicas se relaciona con la aparición de neoplasias en un futuro.

VI.7.- Del análisis citogenético del tejido paratiroideo

Se analizaron 269 metafases del tejido paratiroideo de 15 pacientes y 105 metafases (39%) presentaron anomalías cromosómicas, los hallazgos citogenéticos fueron diversas aberraciones cromosómicas que comentaremos a continuación.

El grupo de los 15 pacientes lo componen: 8 hiperparatiroidismos primarios por adenoma, 4 hiperparatiroidismos secundarios, 2 hiperparatiroidismos terciarios y un MEN Y. Se encontró la pérdida del cromosoma 11 en 3 pacientes (casos: 1, 16 y 17), dichos pacientes corresponden a dos adenomas (casos: 1 y 16) y al paciente con el MEN I (caso 17). La trisomía 11 representa el 18% de las anomalías cromosómicas en nuestro grupo de pacientes. Dicha alteración cromosómica la consideramos un hecho importante, dado que fueron clones celulares en todos ellos.

En 1989, Arnold⁵⁶ publica los hallazgos en 5 pacientes con un adenoma paratiroideo y en un caso encontró la pérdida clonal de un cromosoma 11.

La pérdida del cromosoma 11 podría suceder por diferentes mecanismos cromosómicos, incluyendo la pérdida no justificada de un cromosoma con la duplicación de su homólogo, o la no justificación mitótica con pérdida de un cromosoma 11 homólogo.

Las observaciones realizadas por Arnold⁵⁶ (1989), constituyen una evidencia de la patogénesis monoclonal en la adenomatosis paratiroidea. Además, la naturaleza clonal de la delección del cromosoma muestra el origen patogenético en el desarrollo del adenoma.

La monosomía 11 es una condición bien tolerada por las células neoplásicas paratiroides. En este contexto, es interesante notar que sólo una simple copia del gen de la PTH es suficiente para permitir la función hiperparatiroidea del adenoma. La pérdida de un cromosoma 11 en el adenoma paratiroideo recuerda la publicación de Larson⁶⁰ en 1988, el autor comunica la monosomía 11 en dos insulinomas malignos de un MEN I.

En 1989 Arnold⁵⁶ propuso por primera vez la hipótesis: "existe un gen supresor tumoral que se localiza en el cromosoma 11 y juega un importante papel en la patogénesis de la enfermedad paratiroidea".

Örndal⁶¹ en 1990, publica los hallazgos citogenéticos de un paciente con un hiperparatiroidismo primario por un adenoma. El cariotipo fue realizado tras el cultivo *in vitro* de tejido paratiroideo, el material y la metodología utilizada fue similar a nuestro estudio. El hallazgo más importante fue una traslocación t(1;5)(p22;q32) encontrada en tres células de las 157 metafases estudiadas. El resto de las anormalidades genéticas fueron aberraciones cromosómicas en 15 metafases. En total encontraron un 11.4% de alteraciones cromosómicas.

Diversas diploidías fueron visualizadas en el tejido paratiroideo de nuestro grupo de pacientes, dichas alteraciones se presentaron en 8 (53.3%) casos y tal hallazgo representa el 67.6% de las alteraciones cromosómicas en tejido paratiroideo. La hipodiploidía predominó con un 63.3%, la hipodiploidía se observó en un 36.6%. Esta alteración cromosómica estuvo presente en el HPTp y en el HPTrenal sin diferencia estadística. Tres pacientes (casos 6, 11 y 16) presentaron ambos tipos de diploidías.

Un paciente diagnosticado de hiperparatiroidismo secundario (caso 6)

presentó ambos tipos de diploidías en los leucocitos y en el tejido: hipodiploidía en 22 e hiperdiploidía en 11 leucocitos. En el tejido paratiroideo se encontraron 11 metafases con hipodiploidía y 2 metafases con hiperdiploidía.

Las diploidías publicadas en cultivos de tumores se han encontrado en pacientes con un estadio temprano (Bardi 1995²⁰⁸) y tanto la hipo como la hiperdiploidía la relacionan con el comportamiento (pronóstico) del tumor.

Algunos autores han estudiado el contenido nuclear del ADN de diferentes tejidos paratiroideos, con la finalidad de determinar si éste podría predecir su clasificación patológica y comportamiento biológico [Backdahl 1991²⁰⁹]. Bowlby²¹⁰ y colegas en 1987 utilizaron la citometría de flujo para estudiar 95 glándulas paratiroideas de 79 pacientes y compararon el contenido del ADN nuclear con la histología. Encontraron que todas las glándulas paratiroideas normales y que todas las glándulas de los pacientes con una hiperplasia secundaria mostraban un patrón diploide de ADN. Una pequeña proporción de las glándulas de los pacientes con hiperplasia primaria o adenoma fueron también diploides. Los dos carcinomas examinados presentaron una aneuploidía o un patrón tetraploide. Algunas aneuploidías fueron vistas en glándulas de pacientes con hiperplasia primaria, adenoma y carcinoma, los autores concluyen refiriendo que las medidas del contenido del ADN nuclear solas no fueron de valor diagnóstico, sin embargo el grupo de pacientes con hiperplasia primaria o adenomas que presentaron aneuploidías, podrían tener un potencial para progresar hacia un estado maligno si no se tratan.

La citometría de flujo ha sido utilizada para examinar grandes grupos de pacientes con carcinoma paratiroideo. En un estudio realizado por Obara²¹¹ en 1990, analizó 16 pacientes con un carcinoma paratiroideo, 28 pacientes con un adenoma y 15 glándulas paratiroides de 5 pacientes con un MEN I. Los resultados de este estudio confirman que el contenido nuclear del ADN del tumor no puede ser utilizado para distinguir las lesiones malignas de las benignas. Más importante es que los tumores aneuploides sugieren una más alta incidencia de recurrencias o metástasis que los tumores diploides.

En tres de nuestros casos estuvo implicado el mismo cromosoma, tanto en la sangre periférica como en el tejido paratiroideo, en dos de los casos participaba el cromosoma 11. En los casos 16 y 18 los hallazgos fueron clones celulares en las dos muestras celulares y en el caso N° 18 la alteración cromosómica fue idéntica (45, XX, -12).

No encontramos relación estadística entre las alteraciones cromosómicas y las cifras de calcio y PTH preoperatorios, tanto en leucocitos como en tejido paratiroideo. Tampoco hemos encontrado relación de dichas aberraciones cromosómicas con la evolución de las cifras de calcio y PTH en los meses de seguimiento.

Una paciente (caso 15) con un hiperparatiroidismo primario por un adenoma, presentó también un carcinoma de mama metacrónico. En el cariotipo se encontró un clon celular; 45, XX, -3 en tres leucocitos y una hiperdiploidía > 91 cromosomas en tres leucocitos.

En una revisión efectuada por Palmér¹⁷⁹ en 1988, en la que se estudiaron más de 4000 pacientes con hiperparatiroidismo, observó un aumento general de riesgo de un 50% de aparición de enfermedades malignas. Se piensa que el hiperparatiroidismo favorece la transformación ulterior de tumores malignos o que el hiperparatiroidismo y algunos tumores tienen una tumorigénesis con bases genéticas similares.

Existe una gran escasez de publicaciones sobre estudios citogenéticos en el hiperparatiroidismo. Creemos que ello se debe al tiempo que se necesita para el cultivo *in vitro* y al alto porcentaje de fracasos por la dificultad que plantea el crecimiento del tejido. Otro factor sin duda es el esfuerzo físico ocular necesario. El tiempo dedicado a un análisis citogenético va a depender de los hallazgos, cuantos más hallazgos mayor tiempo empleado; por lo tanto el tiempo de exposición al microscopio para cariotipar cada muestra es muy variado.

Actualmente no existe una alteración cromosómica primaria bien definida para el adenoma e hiperplasia paratiroidea primaria, renal o del MEN. En el hiperparatiroidismo los cambios cromosómicos que se encuentran son muy variados y este enmascaramiento de los cambios cariotípicos es el mayor obstáculo para establecer un cambio primario, pensamos que este hecho dificulta la evolución de las investigaciones citogenéticas.

Existen puntos a favor para que se lleven a cabo estudios citogenéticos de investigación: con tiempo, entusiasmo y una gran variedad de tejidos tumorales estudiado se han establecido los cambios citogenéticos específicos que existen actualmente. Los eventos citogenéticos reflejan un importante evento biológico a nivel celular que ha implicado estrechamente el pronóstico, la supervivencia y una correcta clasificación de algunos pacientes.

El adiestramiento del personal y el material utilizado para realizar un estudio citogenético está hoy en día al alcance económico de cualquier Hospital.

Con el estudio cariotípico podemos investigar todos los cromosomas y tener un campo de investigación más amplio. No nos limitamos al estudio de un cromosoma específico, por lo que consideramos que los estudios citogenéticos son un campo importante en la investigación biomédica con fines al mejor entendimiento de las enfermedades con base genética y por ende al mejoramiento en el tratamiento de los pacientes .

VII. RESUMEN

VII. RESUMEN

En el presente trabajo se estudian 29 pacientes con enfermedad paratiroidea, el grupo lo componen 18 pacientes con hiperparatiroidismo primario (HPTp), 7 pacientes con hiperparatiroidismo secundario (HPTs), 3 pacientes con hiperparatiroidismo terciario (HPTt) y un paciente con síndrome neoplásico endocrino múltiple (MEN I).

Efectuamos un análisis citogenético de linfocitos de sangre periférica (LSP) y de tejido paratiroideo del grupo de pacientes. Las muestras del tejido fueron tomadas en fresco en el quirófano, cuando se trataba de un adenoma se cogían las muestras del mismo y cuando se trató de una hiperplasia tomamos la muestra de aquella glándula que sería autotransplantada.

Hemos realizado un análisis citogenético de LSP en 29 individuos voluntarios sanos, con la finalidad de efectuar un análisis estadístico, comparando los resultados citogenéticos de LSP del grupo de pacientes y del grupo control.

La muestra de LSP de ambos grupos fue recogida en tubos de heparina-litio y se realizaron los siguientes cultivos para cada muestra: 1) Cultivo de 72 horas en medio RPMI-1640, 2) cultivo de 96 horas en medio 199, 3) Cultivo de 72 horas de sincronización con methotrexate y timidina y 4) Cultivo de 72 horas con ethidium bromide.

El tejido paratiroideo se procesó de tres formas diferentes: 1) Técnica directa tras digestión de dos horas con colagenasa tipo II medio F-10 a 37° C,

2) Cultivo de células aisladas por digestión enzimática y 3) Cultivo en explante.

Los cultivos fueron sacrificados independientemente en función del estado y la capacidad mitótica de las células, parando el cultivo con colchicina y siguiendo el protocolo estándar para líquidos amnióticos. Las metafases fueron analizadas por bandeado G y C.

El tiempo del cultivo para el análisis cromosómico de LSP fue de 3 días tanto en el grupo control como en los pacientes.

El crecimiento de LSP fue satisfactorio en 27 pacientes (93.1%), en un paciente solo fue posible analizar 7 leucocitos, y en el otro paciente no creció el cultivo de LSP, esta falta de crecimiento fue considerada como actitud extraña. El crecimiento de los linfocitos en el grupo control fue satisfactoria en todos ellos.

Los tejidos cultivados se observaron diariamente al microscopio y se realizó un registro del comportamiento del mismo, registrando el día de la aparición de los fibroblastos, de los pequeños islotes o colonias celulares y también del fracaso por contaminación o por falta de crecimiento.

En el tejido paratiroideo, tanto en el adenoma como en la hiperplasia, los fibroblastos aparecen a los 6.68 días y se observan colonias celulares a los 7 días después de la aparición de los fibroblastos.

Se necesitaron una media de 91.9 (Rango 3 - 254) días de cultivo para poder analizar citogenéticamente el tejido paratiroideo. Se cultivaron 29 muestras de tejido paratiroideo, de las cuales 23 (79.31%) crecieron y solo en 15 (65.21%) de estas fue posible observar metafases, observandose así un total 269 metafases.

En tres de las muestras el tejido paratiroideo creció, sin embargo no se observaron metafases para su análisis. En 5 (17.24%) de las muestras el tejido creció, sin embargo, un fallo del termostato de la estufa de cultivo celular elevó su temperatura a 60° C, estropeando de tal forma todos los cultivos. En 5 (17.24%) muestras el tejido paratiroideo no creció. En una muestra el tejido se contaminó.

Se comparó el tiempo de crecimiento del cultivo de explante frente al tratado tras digestión enzimática, y observamos que éste último creció más rápido pero no de forma estadísticamente significativa.

Se procedió a la comparación estadística de los resultados del cultivo de tejido paratiroideo frente a los resultados del cultivo de LSP. En el grupo de pacientes; la diferencia estadística fue muy significativa [$p < 0.0001$]. Según nuestros cálculos estadísticos existe un 49 % de posibilidades de fracaso cuando se cultiva el tejido paratiroideo.

El análisis citogenético de LSP del grupo de pacientes que estudiamos mostró anormalidades cromosómicas claras en 22 (78.5%) de los pacientes, en 6 (20.6%) pacientes se consideró normal y en uno (3.4%) no se realizó el estudio por falta de crecimiento de los linfocitos. Se estudiaron 1522 metafases en LSP y

se encontraron alteraciones cromosómicas en 328 metafases (21.55%).

En el grupo control, se estudiaron 725 metafases y el análisis citogenético de LSP fue normal en el 100% de los casos. Se compararon estadísticamente ambos grupos y la diferencia fue muy significativa [$p < 0.0001$].

Se encontraron diversas alteraciones que afectan al cromosoma 11 en 71 linfocitos de 8 pacientes (28.5%), estas alteraciones fueron: pérdida total del cromosoma, aumento en la fragilidad, pérdida de ADN en los brazos cortos "11p-", rotura en 11q24, trisomías, rotura en los brazos largos, cromosoma extraño e inversión del cromosoma, también se visualizaron clones celulares.

Se establecieron clones celulares con el cariotipo 47, XXX en muestras de LSP de tres pacientes, también se encontró el cariotipo 45, X, -X en tres pacientes y se establecieron clones celulares del hallazgo.

Se establecieron importantes clones celulares con la monosomía del cromosoma 17 en 3 casos.

La diploidía por defecto (hipodiploidía) o por ganancia (hiperdiploidía) se visualizó en 137 linfocitos, este hallazgo representa el 41.76% de las anomalías cromosómicas. La hipodiploidía se encontró en 85 metafases de 7 pacientes, de los cuales predominó el hiperparatiroidismo primario por adenoma en un 85.7%. La hiperdiploidía se visualizó en 52 metafases de 4 pacientes, dos de ellos correspondieron a un hiperparatiroidismo secundario y los otros dos a un HPTp por adenoma.

La rotura cromosómica y pérdida de fragmentos (deleción) fue un hecho que se encontro en 14 (50%) pacientes, que representan el 28.9% (n = 95) del total de las alteraciones cromosómicas. Predominaron los pacientes con un adenoma paratiroideo (64.2%).

Se analizaron 269 metafases del tejido paratiroideo de 15 pacientes en los que fue posible realizar el análisis citogenético, el grupo lo componen 8 HPTp (adenomas), 4 HPTs, 2 HPTt y un MEN 1. En 105 metafases (39%) se encontraron anomalías cromosómicas.

La monosomía 11 fue encontrada en 4 casos, este hallazgo representa el 18% de las anomalías cromosómicas en tejido paratiroideo. Dicha monosomía es importante, dado que fueron clones celulares en tres de ellos.

Se encontraron diversas diploidías en el tejido paratiroideo en 8 (53.3%) pacientes que representaron el 67.6% de las alteraciones cromosómicas. La hipodiploidía fue la más frecuente (63.3%). No hubo diferencia en el tipo de hiperparatiroidismo y la presencia de diploidías. En tres pacientes se presentaron los dos tipos de diploidías. En tres casos estuvo implicado el mismo cromosoma, tanto en la muestra de LSP como en el tejido, se trataba del cromosoma 11.

No encontramos relación estadística entre las alteraciones cromosómicas y las cifras de calcio y PTHmi preoperatorios, tanto en LSP como en tejido paratiroideo. Tampoco hemos encontrado relación entre dichas aberraciones cromosómicas y la evolución de las cifras de calcio y PTHmi en los meses de seguimiento.

VIII. CONCLUSIONES

VIII. CONCLUSIONES

1.- El cultivo "*in vitro*" del tejido paratiroideo, tanto del adenoma como de la hiperplasia, presenta dificultades en su crecimiento. Consideramos que el factor más importante es el tiempo, dado que los fibroblastos aparecen a los 6.68 días del inicio del cultivo, observándose colonias celulares 7 días después, sin embargo, se necesita una media de 91.9 días de cultivo para poder analizar citogenéticamente el tejido paratiroideo.

2.- La enfermedad paratiroidea, en todas sus expresiones clínicas, presenta un alto porcentaje de aberraciones cromosómicas que pueden descubrirse en el cultivo de linfocitos de sangre periférica. Las aberraciones encontradas en nuestro grupo de pacientes fueron: iploidías por defecto o ganancia, monosomías, triploidías, traslocaciones, inversiones y deleciones, todos

estos hallazgos citogenéticos son hasta ahora inexplicables. Sin embargo, dichas alteraciones manifiestan una inestabilidad cromosómica que podría encajar en el síndrome del cromosoma frágil.

CONCLUSIONES

3.-En las metafases de los linfocitos de la sangre periférica se visualizaron anomalías del cromosoma 11. En el grupo de pacientes estudiado se encontraron diversas alteraciones, tales como: monosomías, roturas e inversiones en 71 linfocitos, representando el 21.64% del total de las aberraciones cromosómicas en sangre periférica y estando presente en el 28.5% de los casos, con predominio en aquellos pacientes con un adenoma paratiroideo.

4.- Hemos encontrado monosomías comunes de los cromosomas 11 y 12, en linfocitos cultivados de sangre periférica y tejido paratiroideo cultivado "*in vitro*", en dos pacientes. Estas alteraciones celulares fueron encontradas en 3 o más células en ambas muestras, representando así clones celulares importantes en el hiperparatiroidismo.

5.- El cariotipo 47, XXX se visualizó en los linfocitos del 17.64% de los pacientes afectados por un adenoma paratiroideo y se establecieron clones celulares importantes en todos.

6.- El estudio estadístico realizado comparando los hallazgos citogenéticos del grupo de pacientes afectados por hiperparatiroidismo y del grupo de voluntarios sanos, demostró una diferencia estadística muy significativa [$p < 0.00001$] de alteraciones cromosómicas a favor del primero. Este resultado, a nuestro juicio, apoya la teoría de que la enfermedad paratiroidea se acompaña de una cierta inestabilidad cromosómica.

CONCLUSIONES

7.- En este estudio no fue posible establecer una alteración cromosómica primaria en el adenoma e hiperplasia paratiroidea, esto se debió a la falta de crecimiento del tejido paratiroideo en el cultivo "*in vitro*", lo que originó una insuficiencia en el número de metafases para su estudio. Otro problema fue la gran multitud de cambios en el cariotipo.

8.- No encontramos diferencias cromosómicas significativas entre los diferentes tipos de hiperparatiroidismo.

9.- Es necesario un estudio más amplio para poder afirmar que la enfermedad paratiroidea se asocia con el síndrome del cromosoma frágil. También sería interesante el seguimiento estricto y prolongado de los pacientes con hiperparatiroidismo primario que manifiesten aberraciones cromosómicas en linfocitos cultivados de sangre periférica, con la finalidad de observar el desarrollo o no de neoplasias futuras.

IX. BIBLIOGRAFÍA

IX. BIBLIOGRAFÍA

- 1.– Schleicher W. Die knorpelzellteilung ein beitrage zur lehre der teilung von gewebezellen. Arch Mikr Anat 1879; 16: 148–300.
- 2.– Flemming W. Beitrage zur kenntniss der zelle and ihre lebenserscheinungen. Arch Mikr Anat 1882; 20: 1–86.
- 3.– Waldeyer W. Karyokinesis and its relation to the process of fertilization. QJ Microsc Sci 1890; 30: 159–281.
- 4.– Arnold J. Über feinere stuktur der zellen unter normalen end pathologischen bedingungen. Virchow's Arch Pathol Anat 1879; 77: 181–206.
- 5.– Winiwarter H. Estudes sur la spermatogénèse humaine. I cellule de sertoli. Arch Biol 1912; 27: 91–127.
- 6.– Painter TS. The Y–chromosome in mammals. Science 1923; 53: 503–509.
- 7.– Tjio JH, Levan A. The chromosome number of man. Hereditas 1956; 42: 16.
- 8.– Ford CE, Hamerton JL. The chromosome of man. Nature 1956; 178: 1020–1023.

- 9.– Ayala JD. Genética moderna. Eds. Omega, Barcelona 1984.
- 10.– Gelehrter TD, Collins FS: Principles o Medical Genetics. Baltimore, Williams & Wilkins, 1990.
- 11.– Thompsn MW: Genetics in medicine, 5th ed. Philadelphia, Saunders, 1990.
- 12.– Vogel F, Motulsky AG: Human genetics; Problems and approaches, 2d ed. Berlin, Springer–Verlag, 1986.
- 13.– Lewin B: Genes, 4th ed. New York, Wiley, 1990.
- 14.– Morgan R, Sandberg AA, Jarzabek V, Scheerer P, Hecht F. An acquired robertsonian translocation in prolinphocytic leukemia. a case presentation and review. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 25: 293,.
- 15.– McKusick VA: Mendelian Inheritance in Man. 11th ed. Baltimore, Johns Hoptkins University press, 1992.
- 16.– Schleicher W. Die knorpelzellteilung ein beitrog zur lehre der teilung von gewebezellen. *Arch Mikr Anat* 1879; 16: 148,.
- 17.– Scriver CR: The molecular and metabolic basis of inherited disease, 7th ed. New York MacGrow–Hill, 1994.

- 18.– Weatherall DJ: The new genetics and clinical practice, 3d ed. Oxford, Oxford University press, 1991.
- 19.– Howard RO, Breg WR, Albert DM, Lesser RL. Retinoblastoma and chromosome abnormality partial deletion of the long arm of chromosome 13. Arch ophthalmol 1974; 72: 490,.
- 20.– Boveri T: Zur frage der entwicklung laligner tumoren. Jena, 1914.
- 21.– Miles CP. Chromosomes in cancer in LG Koss Eds. Philadelphia JB, Lippincott 1980.
- 22.– Sanchez–Monge E, Jouvé N. Genetica. Eds. Omega, Barcelona 1982.
- 23.– Fuhrmann W, Vogel F. El consejo Genético. Eds.Científico–médica, Barcelona 1984.
- 24.– Mitelman F. Catalog of chromosome aberrations in cancer. 3^a Ed. Alan R. Liss. Inc. New York 1988.
- 25.– Nowell PC, Hungerford DA: A minte chomosome in Human chronic granulocytic leukemia. Science 1960; 132:1497

BIBLIOGRAFÍA

- 26.– Sandberg AA. The chromosomes in human leukemia. *Semin Hematol* 1986; 201–217.
- 27.– Sandberg AA. Chromosomes in human cancer and leukemia. Elsevier New York, 1990.
- 28.– Trent JM, Kaneko Y, Mitelman F: Report of the committee on structural chromosome changes in neoplasia. *Cytogenet Cell Genet* 1989; 51 : 533–562.
- 29.– Sandberg AA. Aneuploidy in human neoplasia. in. Aneuploidy part A: incidence and etiology. Vig BK. Sandberg AA. Eds. Alan R. Liss. New York 1987.
- 30.– Heims, Mitelman F: Cancer cytogenetics. 2nd print ed. AR liss New York, 1989.
- 31.– Sandberg AA, Turc–Carel C. The cytogenetic of solid tumors; Relation to diagnosis classification and pathology. *Cancer* 1987; 59: 387–395.
- 32.– Ballesta F, Cruz M. Chromosomal abnormalities and malignant diseases. *Clin Genet* 1978; 15: 332–345.
- 33.– Ballesta F: Progresos en citogenetica. *Bol Soc Ped* 1973;34: 131–149.

BIBLIOGRAFÍA

- 34.– Gabas LM, Gibas Z, Sandberg AA. Technical aspects of cytogenetic analysis of human solid tumors. *Karyogram* 1984; 10: 25–27.
- 35.–Trent J, Crickard K, Gibas Z. Methodologic advances in the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 19: 57–66.
- 36.– Limon J, Dal Cin P, Sandberg AA. Application of long term collagenase disaggregation for the cytogenetic analysis of human solid tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 305–312.
- 37.– Sandberg AA, Turc-Carel C. The cytogenetics of solid tumors. *Cancer* 1987; 59: 387–395.
- 38.– Reichmann A, Martin P, Levin B. Chromosomal banding patterns in human large bowel adenomas. *Hum Genet* 1985; 70: 28–31.
- 39.– Becher R, Gibas Z, Sandberg AA. Involvement of chromosomes 7 and 12 in large bowel cancer: Trisomy 7 and 12q–. *Cancer Genet Cytogenet* 1983; 9: 329–332.
- 40.– Levin B, Reichmann A. Chromosomes and large bowel tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 19: 159–162.

- 41.– Zang DK. Cytological and cytogenetical studies on human meningioma. *Cancer Genet Cytogenet* 1982; 6: 249–274.
- 42.– Mark J, Dahlenfors R, Ekedahl C. Cytogenetics of the human mixed salivary gland tumour. *Hereditas* 1983; 99: 115–129.
- 43.– Thackray AC, Lucaas RB. Tumors of the salivary glands. In: *Atlas of Tumor Pathology, 2nd Series, Fascicle 10*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 1974; 107–122.
- 44.– Turc-Carel C, Dal Cin P, Rao U, Karakousis C, Sandberg AA. Cytogenetic studies of adipose tumors: I. A benign lipoma with reciprocal translocation $t(3;12)(q28;q14)$. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 283–290.
- 45.– Limon J, Turc-Carel, Dal Cin P, Rao U, Sandberg AA. Recurrent chromosome translocations in liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 22: 93–94.
- 46.– Heim S, Mandahl N, Kristoffersson V. Reciprocal translocation $t(2;12)(q27;q13)$ in lipoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 301–304.

- 47.– Turc–Carel C, Limon J, Dal Cin P, Rao U, Karakousis C, Sandberg AA. Cytogenetic studies of adipose tissue tumors: II. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 291–300.
- 48.– Sreekantaiah C, Karakousis CP, Leong SPL. Trisomy 8 as a nonrandom secondary change en myxoid liposarcoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1991;51:195–205.
- 49.– Turc–Carel C, Limon J, Dal Cin P, Rao U, Karakousis C, Sandberg AA. Cytogenetic Studies of adipose tissue tumors. Recurrent reciprocal translocation t(12;16)(q13;p11) in myxoid liposarcomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 291–299.
- 50.– Karakousis CP, Dal Cin P, Turc–Carel C, Limon J, Sandberg A. Chromosomal changes in soft–tissue sarcomas. *Arch Surg* 1987; 122: 1257–1260.
- 51.– Arnold A. Molecular mechanisms of parathyroid neoplasia. *Endocrino Metabol Clin North Am* 1994; 23: 93–107.
- 52.– Yoshimoto K, Iwahana H, Kubo K, Saito S, Itakura M. Allele loss on chromosome 11 in pituitary tumor from a patient with multiple neoplasia type I. *Jpn Cancer Res* 1991; 82: 886–889.

- 53.– Thakker RV, Pook MA, Wooding C, Boscaro M, Scanarini M, Clayton RN. Association of somatotrophinoma with loss of alleles on chromosome 11 and gps mutations. *J Clin Invest* 1993; 91: 2815–2821.
- 54.– Motokura T, Bloom T, Kim HG. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991; 350: 512–515.
- 55.– Byström C, Larsson C, Blomberg C. Localization of the MEN 1 gene to a small region within chromosome 11q13 by deletion mapping in tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 1968–1972.
56. Arnold A, Kim HG. Clonal loss of one chromosome 11 in a parathyroid adenoma. *L Clin Endocrinol Metabol* 1989; 69: 496–499.
57. – Friedman E, Bale AE, Marx SL. Genetic abnormalities in sporadic parathyroid adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 293–297.
- 58.– Friedman E, De Marco L, Gejman PV. Allelic loss from chromosome 11 in parathyroid tumors. *Cancer Research* 1992; 52: 6894–6809.
- 59.– Arnold A, Brown M, Ureña P. X– inactivation analysis of clonality in primary and secondary parathyroid hyperplasia. *J Bone Min Res* 1992; 7s: 153.

- 60.– Larson C, Skogseid B, Oberg K, Nakamura Y, Nordenskjöld M. Multiple endocrine neoplasia type I gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature* 1988; 332: 85–87.
- 61.– Örndal C, Johansson M, Heim S, Mandahl, Mansson B, Alumets J, Mitelman F. Parathyroid adenoma with t(1;5)(p22;q32) as the sole clonal chromosome abnormality. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 48: 225–228.
- 62.– Rey JA, Bello MJ, Campos JM, Kusak E, Martínez–Castro P, Benítez J. A case of pituitary adenoma with 58 chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 23: 171–174.
- 63.– Bondeson L, Bengtsson A, Bondeson AG, Dahlenfors R, Wedell B, Mark J. Chromosome studies in thyroid neoplasia. *Cancer* 1989; 64: 680–685.
- 64.– Bartnitzke S, Herrmann ME, Lobeck H, Zuschneid W, Neuhaus P, Bullerdiek J. Cytogenetic findings on eight follicular thyroid adenomas including one with a t(10;19). *Cancer Genet Cytogenet* 1989; 39: 65–68.
- 65.– Antonini P, Venuat AM, Berger R, Caillou B, Rossignol JL, Parmentier C. Cytogenetic abnormalities in thyroid tumors. Book Abstracts, 1st European Workshop on Cytogenetics and Molecular genetics of Human Solid Tumors. Dijon 1988.

66.– Sherwood LM, Potts JT, Care AD, Mayer GD, Aurbach GD. Evaluation by radioimmunoassay of factors controlling the secretion of parathyroid hormone. *Nature* 1966; 209: 52–60.

67.– Brown EM. PTH secretion in vivo and in vitro: Regulation by calcium and other secretagogues. *Miner Electrolyte Metab* 1982; 8: 130,.

68.– Habener JT, Potts JT. Relative effectiveness of magnesium and calcium on the secretion and biosynthesis of parathyroid hormone in vitro. *Endocrinology* 1976; 98: 197,.

69.– Rudberg C, Åkerström G, Ljunghall S, Grimelius L, Johansson H, Pertoft H, Wide L. Regulation of parathyroid hormone release in primary and secondary hyperparathyroidism: Studies in vivo and in vitro. *Acta Endocrinol* 1982; 101: 408,.

70.– Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT Jr. Parathyroid hormone: Biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev* 1984; 64: 985,.

71.– Rubin RP. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones. *Pharmacol Rev* 1970; 22: 389,.

72.– Wallach D. Information transfer between cells: Fundamentals of receptor molecular biology. Immunology series 34. New York Marcel Dekker Inc. pp 1–51. 1978.

73.– Douglas WW. Stimulus–secretion coupling: The concept and clues from chromaffin and other cells. *Br J Pharmacol* 1968; 34: 451,.

74.– Brown EM, Thatcher JG. Adenosine 3' , 5' –monophosphate (cAMP)–dependent protein kinase and the regulation of parathyroid hormone release by divalent cations and agents elevating cellular cAMP in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1982; 110: 1374,.

75.– Kobayashi N, Russell J, Lettiere D, Sherwood LM. Regulation of protein kinase C by extracellular calcium in bovine parathyroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 4857,.

76.– Morrissey JJ, Cohn DV. Regulation of secretion of parathormone and secretory protein–I from separate intracellular pools by calcium, dibutyryl cyclic AMP, and (1)–isoproterenol. *J Cell Biol* 1979; 82: 93,.

77.– Lasker RD, Spiegel AM. Endogenous substrates for cAMP dependent phosphorylation in dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1982; 11: 1412,.

78.– Gylfe E, Larsson R, Johansson H, Nygren P, Rastad J, Wallfelt C, Akerström G. Calcium-activated calcium permeability in parathyroid cells. FEBS Lett 1986; 205: 132,.

79.– Juhlin C, Holmdahl R, Johansson H, Rastad J, Akerström G, Klareskog L. Monoclonal antibodies with exclusive reactivity against parathyroid cells and tubule cells of the kidney. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 2990,.

80.– Brown E, Enyedi P, LeBoff M, Rotberg J, Preston J, Chen C. High extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} stimulate accumulation of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. FEBS Lett 1987; 218: 113,.

81.– Gylfe E, Johansson H, Larsson R, Nygren P, Rastad J, Wallfelt C, Akerström G. Activation of Ca^{2+} influx into parathyroid cells by external cation binding. In Calcium Regulation and Bone Metabolism: Basic and Clinical Aspects, D. V. Cohn TJ, Martin PJ. Meunier, Ed Amsterdam, Elsevier, 1987, pp. 33–38.

82.– Kifor O, Brown EM. Relationship between diacylglycerol levels and extracellular Ca^{2+} in dispersed bovine parathyroid cells. Endocrinology 1988; 123: 2723,.

BIBLIOGRAFÍA

- 83.– Brown EM, Gardner DG, Windeck RA, Aurbach GD. Relationship of intracellular 3' , 5'-adenosine monophosphate accumulation to parathyroid hormone release from dispersed bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1978; 103: 2323,.
- 84.– Larsson R, Wallfelt C, Abrahamsson H, Gylfe E, Ljunghall S, Rastad J, Rorsman P, Wide L, Akerström G. Defective regulation of the cytosolic Ca^{2+} activity in parathyroid cells from patients with hyperparathyroidism. *Biosci Rep* 1984; 4: 909,.
- 85.– Aston JP, Brown RC, Curley I, Wheeler MH, Woodhead JS. Secretion of intact PTH by dispersed human hyperparathyroid cells. *Clin Endocrinol* 1988; 29: 643,.
- 86.– Brown EM, Leombruno R, Thatcher J, Burrowes M. The acute secretory response to alterations in extracellular calcium concentration and dopamine in perfused bovine parathyroid cells. *Endocrinology* 1985; 116: 1123,.
- 87.– Wallfelt C, Lindh E, Larsson R, Johansson H, Rastad J, Akerström G, Gylfe E. Kinetic evidence for cytoplasmic calcium as an inhibitory messenger in parathyroid hormone release. *Biochim Biophys. Acta* 1988; 969: 257,.

BIBLIOGRAFÍA

- 88.– Adami S, Muirhead N, Msnning RM, Gleed JH, Papapoulos SE, Sandler LM, Catto GRD, O'Riordan JLH. Control of secretion of parathyroid hormone in secondary hyperparathyroidism. *Clin Endocrinol* 1982; 16: 463,.
- 89.– Grant FD, Conlin PR, Brown EM. Rate and concentration dependence of parathyroid dynamics during stepwise changes in serum ionized calcium in normal humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 71: 370,.
- 90.– Cantley LK, Ontjes DA, Cooper CW, Thomas CG, Leight GS, Wells SA Jr. Parathyroid hormone secretion from dispersed human hyperparathyroid cells: Increased secretion in cells from hyperplasic glands versus adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 60: 1032,.
- 91.– Morrissey JJ, Hamilton JW, MacGregor RR, Cohn DV. The secretion of parathormone fragments 34–84 and 37–84 by dispersed porcine parathyroid cells. *Endocrinology* 1980; 107: 164,.
- 92.– MacGregor RR, Hamilton JW, Cohn DV. The by-pass of tissue hormone stores during the secretion of newly synthesized parathyroid hormone. *Endocrinology* 1975; 97: 178,.
- 93.– Dietel M, Dorn-Quint G. By-pass secretion of human parathyroid adenomas: A particular intracellular form of rapid adaptation to external stimuli. *Lab Invest* 1980; 43: 116,.

BIBLIOGRAFÍA

- 94.– Mayer GP, Keaton JA, Hurst JC, Habener JF. Effects of plasma calcium concentration on the relative proportion of hormone and carboxyl fragments in parathyroid venous blood. *Endocrinology* 1979; 104: 1778,.
- 95.– Cohn DV, MacGregor RR. The biosynthesis, intracellular processing, and secretion of parathormone. *Endocr Rev* 1981; 2: 1,.
- 96.– Sherwood LM, Cantley L, Russell J. Effects of calcium and $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ on the synthesis and secretion of parathyroid hormone. In *Calcium Regulation and Bone Metabolism*, D.V. Cohn TJ, Martin PJ. Meunier, Ed. Amsterdam, Elsevier 1987, pp. 778–781.
- 97.– Russell J, Lettieri D, Sherwood LM. Direct regulation by calcium of cytoplasmic messenger ribonucleic acid coding for preproparathyroid hormone in isolated bovine parathyroid cells. *J Clin Invest* 1983; 72: 1851,.
- 98.– Nygren P, Larsson R, Johansson H, Ljunghall S, Rastad J, Akerström G. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ inhibits hormone secretion and proliferation but not functional dedifferentiation of cultured bovine parathyroid cells. *Calcif Tissue Int* 1988; 43: 213,.
- 99.– Delmez JA, Tindira C, Grooms P, Dusso A, Windus DW, Slatopolsky E. Parathyroid hormone suppression by intravenous $1,25$ -dihydroxyvitamin D: A role for increased sensitivity to calcium. *J Clin Invest* 1989; 83: 1349,.

100.– Okazaki T, Igarashi T, Kronenberg HM. 5'-flanking region of the parathyroid hormone gene mediates negative regulation by 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃. J Biol Chem 1988; 263: 2203,.

101.– Akerström G, Rastad J, Ljunghall S, Ridefelt P, Juhlin C, Gylfe E. Cellular Physiology and pathophysiology of the parathyroid glands. W J Surg 1991; 15: 672–680.

102.– Wallfelt C, Gylfe E, Larsson R, Ljunghall S, Rastad J, Akerström G. Relationship between external and cytoplasmic calcium concentrations, parathyroid hormone release and weight of parathyroid glands in human hyperparathyroidism. J Endocrinol 1988; 116: 457,.

103.– Brown EM, Gardner DG, Brennan MF, Marx SJ, Spiegel AM, Attie MF, Downs RW Jr., Doppman JL, Aurbach GD. Calcium-regulated parathyroid hormone release in primary hyperparathyroidism: Studies in vitro with dispersed parathyroid cells. Am J. Med 1979; 66: 923,.

104.– Nygren P, Gylfe E, Larsson R, Johansson H, Juhlin C, Klareskog L, Akerström G, Rastad J. Modulation of the Ca²⁺-sensing function of parathyroid cells in vitro and in hyperparathyroidism. Biochim Biophys Acta 1988; 968: 253,.

- 105.– Benson L, Rastad J, Ljunghall S, Rudberg C, Akerström G. Parathyroid hormone release in vitro in hyperparathyroidism associated with multiple endocrine neoplasia type I. *Acta Endocrinol* 1987; 114: 12,.
- 106.– Larsson R, Wallfelt C, Akerström G, Ljunghall S, Rastad J, Gylfe E. Normalizing effect of Ca^{2+} ionophore on cytoplasmic Ca^{2+} and parathyroid hormone release of dispersed parathyroid cells from patients with hyperparathyroidism. *Mol Cell Endocrino* 1986; 45: 191,.
- 107.– Wallfelt CH, Larsson R, Gylfe E, Ljunghall S, Rastad J, Akerström G. Secretory disturbance in hyperplastic parathyroid nodules of uremic hyperparathyroidism: Implication for parathyroid autotransplantation. *World J Surg* 1988; 12: 431,.
- 108.– Nygren P. Functional dedifferentiation of parathyroid cells in hyperparathyroidism and during culture. *Acta Univ Ups* 1987; 114:1,.
- 109.– Larsson R, Akerström G, Gylfe E, Johansson H, Ljunghall S, Rastad J, Wallfelt C. Paradoxical effects of K^{+} and D-600 on parathyroid hormone secretion and cytoplasmic Ca^{2+} in normal bivariate and pathological human parathyroid cells. *Biochim Biophys Acta* 1985; 847: 263,.

BIBLIOGRAFÍA

- 110.– Wallfelt C, Larsson R, Johansson H, Rastad J, Akerström G, Ljunghall S, Gylfe E. Stimulus–secretion coupling of parathyroid hormone release: Studies of ^{45}Ca and ^{86}Rb fluxes. *Acta Physiol Scand* 1985; 124: 239,.
- 111.– Brown EM, LeBoff MS, Oetting M, Posillico JT, Chen C. Secretory control in normal and abnormal parathyroid tissue. *Recent Prog Horm Res* 1987; 43: 337,.
- 112.– Brown AJ, Dusso A, Lopez–Hilker S, Lewis–Finch J, Grooms P, Slatopolsky E. $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ receptors are decreased in parathyroid glands from chronically uremic dogs. *Kidney Int* 1989; 35: 19,.
- 113.– Johansson H, Rastad J, Bjerneröth G, Gylfe E, Akerström G. Microfluorometric measurements of cytoplasmic calcium in chief and oxyphil parathyroid cells of adenomatous and hyperplastic glands and of normal–sized glands associated with adenomas. *Surgery* 1989; 106: 517,.
- 114.– Brown EM. Four–parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; 56: 572,.
- 115.– Duh QY, Gum ET, Sancho JJ, Levin KE, Raper SE, Clark OH. Epidermal growth factor receptors in parathyroid tumors. *J Surg Res* 1986; 40: 569,.

BIBLIOGRAFÍA

- 116.– Hellman P, Bjerneröth G, Juhlin C, Ridefelt P, Rastad J, Akerström G, Jüppner H. Immunohistochemical evidence of parathyroid hormone–related protein in human parathyroid tissue. *Endocr Pathol* 1990; 1: 172,.
- 117.– Rodda CP, Kubota M, Heath JA, Ebeling PR, Moseley JM, Care AD, Caple IW, Martin TJ. Evidence for a novel parathyroid hormone–related protein in fetal lamb parathyroid glands and sheep placenta: Comparisons with a similar protein implicated in humoral hypercalcaemia of malignancy. *J Endocrinol* 1988; 117: 261,.
- 118.– Sakaguchi K, Santora A, Zimering M, Cucio F, Aurbach GD, Brandi ML. Functional epithelial cell line cloned from rat parathyroid glands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 3269.
- 119.– Brandi ML, Aurbach GD, Fitzpatrick LA, Quarto R, Spiegel AM, Bliziotes MM, Norton JA, Doppman JL, Marz SJ. Parathyroid mitogenic activity in plasma from patients with familial multiple endocrine neoplasia type I. *N Engl J Med* 1986; 314: 1287,.
- 120.– Akerström G, Rudberg C, Grimelius L, Bergström R, Johansson H, Ljunghall S, Rastad J. Histologic parathyroid abnormalities in an autopsy series. *Hum Pathol* 1986; 17: 520,.

BIBLIOGRAFÍA

- 121.– Cruz Vigo F, Matínez JI, Menéndez JM, Yuste P, Gómez O, Martín M, Lapuente F, Pardo R, Blanco S, Cruz Caro F. Resultados del tratamiento quirúrgico del hiperparatiroidismo primario. *Cirugía Española* 1991; 50: 230,.
- 122.– Castillo JM. Fisiopatología y clínica del hiperparatiroidismo primario. *Cirugía Española* 1991; 50: 186 ,.
- 123.– Joborn C, Ljunghall S, Larsson K, Lindh E, Naessen T, Wide L, Akerström G, Rastad J. Skeletal responsiveness to parathyroid hormone in healthy females: Relationship to menopause and estrogen replacement. *Clin Endocr* 1991; 34: 335,.
- 124.– Christensson T, Hellström K, Wengle B, Alveryd A, Wikland B. Prevalence of hypercalcaemia in a health screening in Stockholm. *Acta Med Scand* 1976; 200: 131,.
- 125.– Palmér M, Jakobsson S, Akerström G, Ljunghall S. Prevalence of hypercalcemia in a health survey: A 14-year follow-up of serum calcium values. *Eur J Clin Invest* 1988; 118: 39,.
- 126.– Parado A. Estudio crítico del diagnóstico bioquímico del hiperparatiroidismo primario. *Cirugía Española* 1991; 50: 198,.

BIBLIOGRAFÍA

- 127.– Heath H III, Hodgson SF, Kennedy MA. Primary hyperparathyroidism: Incidence, morbidity and economic impact in a community. *N Engl J Med* 1980; 302: 189.
- 128.– Stenström G, Hedman PA. Clinical findings in patients with hypercalcaemia: A final investigation based on biochemical screening. *Acta Med Scand* 1974; 195: 473,.
- 129.– Melton LJ. Epidemiology of primary hyperparathyroidism: National Institutes of Health Consensus Development Conference. *J Bone Miner Res* 1991; 6 (suppl) 2.
- 130.– Ljunghall S, Källsen R, Backman U, Danielson BG, Grimelius L, Johansson H, Thorén L, Werner I. Clinical effects of parathyroid surgery in normocalcaemic patients with recurrent renal stones. *Acta Chir Scand* 1980; 146: 161,.
- 131.– Yendt ER, Gagné RJA. Detection of primary hyperparathyroidism with special reference to its occurrence in hypercalciuric females with normal or borderline serum calcium. *Can Med Assoc J* 1968; 98: 331,.

BIBLIOGRAFÍA

- 132.– Benson L, Ljunghall S, Groth T, Falk H, Hvarfner A, Rastad J, Wide L, Akerström G. Optimal discrimination of mild hyperparathyroidism with serum calcium, ionized calcium and parathyroid hormone measurements. *Ups J Med Sci* 1987; 92: 147,.
- 133.– Groth TL, Ljunghall S, DeVerdier CH. Optimal screening for patients with hyperparathyroidism with use of serum calcium observations: A decision-theoretical analysis. *Scand J Clin Lab Invest* 1983; 43: 499,.
- 134.– Ljunghall S, Hedstrand H. Epidemiology of renal stones in a middle-aged male population. *Acta Med Scand* 1975; 197: 439,.
- 135.– Ladenson JH. Blood calcium determination in primary hyperparathyroidism: National Institutes of Health Consensus Development Conference. *J Bone Miner Res* 1991; 6 (suppl): 2,.
- 136.– Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, Brennan GL, Nozawa-Ung K, Kim LY, Keutmann HT, Wang CA, Potts JT Jr, Segre GV. Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clin Chem* 1987; 33: 1364,.

137.– Nussbaum SR. Sensitive immunometric assays for parathyroid hormone and their impact on the diagnosis and management of hyperparathyroidism: National Institutes of Health Consensus Development Conference. *J Bone Miner Res* 1991; 6 (suppl): 2,.

138.– Ljunghall S, Larsson K, Lindh E, Lindqvist U, Rastad J, Akerström G, Wide L. Disturbance of basal and stimulated serum levels of intact parathyroid hormone in primary hyperparathyroidism. *Surgery* 1991; 110: 47,.

139.– Rutledge R, Stiegel M, Thomas CG, Wild RE. The relation of serum calcium and immunoparathormone levels to parathyroid size and weight in primary hyperparathyroidism. *Surgery* 1985; 98: 1107,.

140.– Wallfelt C, Gylfe E, Larsson R, Ljunghall S, Rastad J, Akerström G. Relation between external and cytoplasmic calcium concentrations, parathyroid hormone release and glandular weight in hyperparathyroidism. *J Endocrinol* 1988; 116: 457,.

141.– Broadus AE, Horst RL, Littledike ET, Mahaffey JE, Rasmussen H. Primary hyperparathyroidism with intermittent hypercalcemia: Serial determinations and simple diagnosis by means of an oral calcium tolerance test. *N Engl J Med* 1980; 12: 225,.

BIBLIOGRAFÍA

- 142.– Gálvez R, Gaméz P, Hiaz–Hellin V. Hipercalcemia y carcinoma broncogenico. Archivos de Bronconeumologia 1995; 31: 489,.
- 143.– Parisien M, Silverberg SL, Shane E, Dempster D, Bilezikian JP. Bone disease in primary hyperparathyroidism. Endocrinol Metab Clin North Am 1990; 19: 19,.
- 144.– Palmér M, Ljunghall S, Akerström G, Adami HO, Bergström R, Grimelius L, Rudberg C, Johansson H. Patients with primary hyperparathyroidism operated on over a 24–year period: temporal trends of clinical and laboratory findings. J Chronic Dis 1987; 40: 121,.
- 145.– Parisien M, Silverberg S, Shane E, DeLaCruz L, Lindsay R, Bilezikian JP, Dempster D. The histomorphometry of bone in primary hyperparathyroidism: Preservation of cancellous bone structure. J Clin Endocrino Metab 1990; 70: 930,.
- 146.– Silverberg SJ, Shane E, DeLACruz L, Dempster D, Feldman F, Seldin D. Skeletal disease in primary hyperparathyroidism. J Bone miner Res 1989; 4: 283,.
- 147.– Eriksen EF, Mosekilde L, Melsen F. Trabecular bone remodelling and balance in primary hyperparathyroidism. Bone 1986; 7: 213,.

- 148.– Larsson K, Lindh E, Lind L, Persson I, Ljunghall S. Increased fracture risk in hypercalcemia: Bone mineral content measured in hyperparathyroidism. *Acta Orthop Scand* 1989; 60: 268,.
- 149.– Martin P, Bergmann P, Gillet C, Fuss M, Kinnaert P, Corvilain J, Van Geertruyden J. Long-term irreversibility of bone loss after surgery for primary hyperparathyroidism. *Arch Intern Med* 1990; 150: 1495,.
- 150.– Rao SD, Wilson RJ, Kleerekoper M, Parfitt AM. Lack of biochemical progression or continuation of accelerated bone loss in mild asymptomatic primary hyperparathyroidism: Evidence for biphasic disease course. *J Clin Endocrinol Metab* 1988; 67: 1294,.
- 151.– Mautalen C, Reyes HR, Ghiringelli G, Fromm G. Cortical bone mineral content in primary hyperparathyroidism: Changes after parathyroidectomy. *Acta Endocrinol Copenh* 1986; 111: 494,.
- 152.– Block MA, Dailey GE, Muchmore DE. Bone demineralization, a factor of increasing significance in the management of primary hyperparathyroidism. *Surgery* 1989; 106: 1063,.

- 153.– Peacock M, Horsman A, Aaron JE, Marshall DH, Selby PL, Simpson M. The role of parathyroid hormone in bone loss. In Osteoporosis 1, C. Christiansen, C.D. Arnaud, B.E.C. Nordin, Eds, Denmark, Aalborg Stiftsbogtrykkers 1984, pp. 463–68.
- 154.– Wilson RJ, Rao SD, Ellis B, Kleerekoper M, Parfitt AM. Mild asymptomatic hyperparathyroidism is not a risk factor for vertebral fractures. *Ann Intern Med* 1988; 109: 959,.
- 155.– Ljunghall S, Hellman P, Rastad J, Akerström G. Primary hyperparathyroidism: Epidemiology, diagnosis and clinical picture. *W J Surg* 1991; 15: 681,.
- 156.– Backman U, Danielson BG, Johansson G, Ljunghall S, Wikström B. Incidence and clinical importance of renal tubular defects in recurrent renal stone formers. *Nephron* 1980; 25: 96,.
- 157.– Backman U, Danielson BG, Fellström B, Johansson G, Ljunghall S, Wikström B. Clinical and laboratory findings in patients with medullary sponge kidney. In *Urolithiasis: Clinical and Basic Research*, L.H. Smith, Eds., New York, Plenum Publishing Corporation 1981, pp 113–20.
- 158.– Lafferty FW. Differential diagnosis of hypercalcemia: National Institutes of Health Consensus Development. *J Bone Miner Res* 1991; 6: 2,.

BIBLIOGRAFÍA

159.– Silverberg SJ, Shane E, Jacobs TP, Siris ES, Gartenberg F, Seldin D, Clemens TL, Bilezikian JP. Nephrolithiasis and bone involvement in primary hyperparathyroidism. *Am J Med* 1990; 89: 327,.

160.– Broadus AE, Horst RL, Lang R, Littledike ET, Rasmussen H. The importance of circulating 1,25(OH)₂D in the pathogenesis of hypercalciuria and renal stone formation in primary hyperparathyroidism. *N Engl J Med* 1980; 302: 421,.

161.– Ljunghall S, Danielson BG, Johansson G, Wibell L. Renal stone formation in primary hyperparathyroidism: Role of tubular dysfunction. In *Urolithiasis: Clinical and Basic Research*, L.H. Smith, Eds., New York, Plenum Publishing Co. 1981, pp: 89–92.

162.– Pak CYC. Effect of parathyroidectomy on crystallization of calcium salts in urine of patients with primary hyperparathyroidism. *Invest Urol* 1979; 17: 146,.

163.– Benson L, Rastad J, Wide L, Akerström G, Ljunghall S. Stimulation of parathyroid hormone secretion by EDTA infusion: A test for the differential diagnosis of hypercalcaemia. *Acta Endocrinol* 1986; 111: 498,.

BIBLIOGRAFÍA

- 164.– Ljunghall S, Benson L, Wide L, Akerström G, Rastad J. Improved differential diagnosis of hypercalcemia by discriminant analysis of laboratory test. *Arch Intern Med* 1981; 141: 1761,.
- 165.– Joborn C, Hetta J, Rastad J, Agren H, Akerström G, Ljunghall S. Psychiatric symptoms and cerebrospinal fluid monoamine metabolites in patients with primary hyperparathyroidism. *Biol Psychiatry* 1988; 23: 149,.
- 166.– Joborn C, Hetta J, Lind L, Rastad J, Akerström G, Ljunghall S. Self-rated psychiatric symptoms in patients with primary hyperparathyroidism. *Surgery* 1989; 105: 72,.
- 167.– Joborn C, Jaborn H, Rastad J, Akerström G, Ljunghall S. Maximal isokinetic muscle strength in patients with primary hyperparathyroidism before and after parathyroid surgery. *Br J Surg* 1988; 75: 77,.
- 168.– Joborn C, Rastad J, Stalberg E, Akerström G, Ljunghall S. Muscle function in patients with primary hyperparathyroidism. *Muscle Nerve* 1989; 12: 87,.
- 169.– Joborn C, Hetta J, Palmér A, Akerström G, Ljunghall S. Psychiatric symptomatology in patients with primary hyperparathyroidism. *Ups J Med Sci* 1986; 91: 77,.

BIBLIOGRAFÍA

- 170.– Turken SA, Cafferty M, Silverbeerg SJ, DeLaCruz L, Cimino C, Lange DJ, Lovelace RE, Bilezikian JP. Neuromuscular involvement in mild, asymptomatic primary hyperparathyroidism. *Am J Med* 1989; 87: 553,.
- 171.– Joborn C, Hetta J, Frisk P, Palmér M, Akerström G, Ljunghall S. Primary hyperparathyroidism in patients with organic brain syndrome. *Acta Med Scand* 1985; 219: 91,.
- 172.– Lafferty FW. Primary hyperparathyroidism: Changing clinical spectrum, prevalence of hypertension and a discriminant analysis of laboratory tests. *Arch Intern Med* 1981; 141: 1761,.
- 173.– Palmér M, Adami HO, Bergström R, Jakobsson S, Akerström G, Ljunghall S. Survival and renal function in persons with untreated hypercalcaemia: A population-based cohort study with 14 years of follow-up. *Lancet* 1987; 1: 59,.
- 174.– Lind L, Wengle B, Wide L, Ljunghall S. Hypertension in primary hyperparathyroidism: Reduction of blood pressure by long-term treatment with vitamin D (alphacalcidol). A double-blind, placebo-controlled study. *Am J Hypertens* 1988; 2: 397,.
- 175.– Ljunghall S, Lithell H, Vessby B, Wide L. Glucose and lipoprotein metabolism in primary hyperparathyroidism: Effects of parathyroidectomy. *Acta Endocrinol* 1978; 89: 580,.

BIBLIOGRAFÍA

- 176.– Ljunghall S, Palmér M, Akerström G, Wide L. Diabetes mellitus, glucose tolerance and insulin response to glucose in patients with primary hyperparathyroidism before and after parathyroidectomy. *Eur J Clin Invest* 1983; 13: 373,.
- 177.– Ljunghall S, Akerström G. Urate metabolism in primary hyperparathyroidism. *Urol Int* 1982; 37: 73,.
- 178.– Palmér M, Adami HO, Bergström R, Akerström G, Ljunghall S. Mortality after operation for primary hyperparathyroidism: A follow-up of patients operated on during 1956–1979. *Surgery* 1987; 102: 1,.
- 179.– Palmér M, Adami HO, Krusemo UB, Ljunghall S. Increased risk of malignant disease after operation for primary hyperparathyroidism: A nation-wide cohort study. *Am J Epidemiol* 1988; 127: 1031,.
- 180.– Sancho JJ, Riera R, Sitges-Serra. Teorías etiopatogénicas del hiperparatiroidismo renal y sus consecuencias terapéuticas. *Cirugía Española* 1991; 50: 192,.
- 181.– Harrison BJ, Wheeler MH. Asymptomatic primary hyperparathyroidism. *World J Surg* 1991; 15: 724,.

BIBLIOGRAFÍA

- 182.– Heath H III, Hodgson SF, Kennedy MA. Primary hyperparathyroidism: incidence, morbidity, and potential economic impact in a community. *N Engl J Med* 1980; 302: 189,.
- 183.– Cope O. The story of hyperthyroidism at the Massachusetts General Hospital. *N Engl J Med* 1966; 274: 174,.
- 184.– San Román Terán JM, Turrión F, Díaz–Miguel M, Ramos F. Táctica y técnica quirúrgicas en la Cirugía del hiperparatiroidismo. *Cirugía Española* 1991; 50: 213,.
- 185.– Churchill ED, Cope O. Parathyroid tumors associated with hyperparathyroidism. *Surg Gyn Obst* 1934; 55: 255,.
- 186.– San Román JM. Cirugía del hiperparatiroidismo. Madrid Ed. Científico–Medica, 1979.
- 187.– Carty SE, Norton JA. Management of patients with persistent or recurrent primary hyperparathyroidism. *World J Surg* 1991; 15: 716,.
- 188.– Esselstyn CB Jr. Parathyroid pathology: Its relations to choice of operation for hyperparathyroidism. *W J Surg* 1977; 1: 701,.

- 189 Hecht F. Trisomy and Disomy in tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 80:171,.
- 190.– Younes A, Jendiroba D, Katz R, Hill D, Cabanillas F, Andreeff M. Chromosome X numerical abnormalities in patients with non-Hodkin's lymphoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 82: 23,.
- 191.– Riske CB, Morgan R, Ondreyco S, Sandberg AA. X and Chromosome loss as sole abnormality in acute non-lymphocytic leukemia (ANLL). *Cancer Genet Cytogenet* 1994; 72: 44,.
- 192.– Pierre RV, Hoagland HC. 45, X cell lines in adult men: loss of chromosome, a normal aging phenomenon? *Mayo Clin Proc* 1971; 46: 52,.
- 193.– Logan JA, Seizinger BR, Atkins L, Martuza R. Loss of the Y chromosome in meningiomas. A molecular genetic approach. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 45: 41,.
- 194.– Powell I, Tyrkus M, Kleer E. Apparent correlation of sex chromosome loss and disease course in urothelial cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 50; 97,.
- 195.– Kwong YL, Wong KF. Hyperdiploid acute myeloid leukemia. Relationship between blast size and karyotype demonstrated by fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 83: 1,.

- 196.– Onodera N, McCabe NR, Rubin CM. Formation of a hyperdiploid karyotype in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1992; 80: 203,.
- 197.– Gustavson KH, Jansson R, Oberg K. Chromosomal breakage in multiple endocrine adenomatosis (types I and II). *Clin Genet* 1983; 23: 143,.
- 198.– Benson L, Gustavson KH, Rastad J, Akerström G, Oberg K, Ljunghall S. Cytogenetical investigations in patients with primary hyperparathyroidism and multiple endocrine neoplasia type 1. *Hereditas* 1988; 108: 227,.
- 199.– Scappaticci S, Maraschio P, Del Ciotto N, Fossati GS, Zonta A, Fraccaro M. Chromosome abnormalities in lymphocytes and fibroblasts of subjects with multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet* 1990; 52: 85,.
- 200.– Tomassetti P, Cometa G, Del Vecchio E, Baserga M, Faccioli P, Bosoni D, Paolucci G, Barbara D. Chromosomal instability in multiple endocrine neoplasia type 1. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 79: 123,.
- 201.– Hecht F, Hecht BK. Unstable chromosomes in heritable tumor syndromes. Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1). *Cancer Genet Cytogenet* 1991; 52: 131,.
- 202.– Sutherland GR. Heritable fragile sites on human chromosomes I. Factors affecting expression in lymphocyte culture. *Amer J Hum Genet* 1979; 31: 125,.

- 203.– Ashby J, Richardson CR. Tabulation and assessment of 113 human surveillance cytogenetic studies conducted between 1965 and 1984. *Mutat Res* 1985; 154: 11,.
- 204.– Solomon E, Borrow J, Goddard AD. Chromosome aberrations and cancer. *Science* 1991; 254: 1153,.
- 205.– Sorsa M, Wilbourn J, Vainio H. Human cytogenetic damage as a predictor of cancer risk. In: Vanio H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ Eds. *Mechanisms of carcinogenesis in risk identification*. IARC Scientific Publications, No 116, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp 543–554, 1992.
- 206.– Hagmar L, Brogger A, Hansteen IL, Heim S, Högstedt B, Knudsen L. Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Research* 1994; 54: 2919,.
- 207.– Bonassi S, Abbondandolo A, Camurri L, Dal Prá L, De Ferrari M, Degraffi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Padovani P, Sbrana I, Vecchio D, Puntoni R. Are chromosome aberration in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans?. Preliminary results of an Italian cohorts study. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 79: 133,.

BIBLIOGRAFÍA

- 208.- Bardi G, Pandis N, Schousboe K, Holund B, Heim S. Near-diploid karyotypes with recurrent chromosome abnormalities characterize early-stage endometrial cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 1995; 80: 110,.
- 209.- Backdahl M, Howe JR, , Lairmore TC, Wells AS Jr. The molecular biology of parathyroid disease. *World J Surg* 1991; 15: 756,.
- 210.- Bowlby LS, DeBault LE, Abraham SR. Flow cytometric analysis of parathyroid glands: Relationships between nuclear DNA and pathologic classifications. *Am J Pathol* 1987; 128: 338,.
- 211.- Obara T, Fujimoto Y, Hirayama A, Kanaji Y, Ito Y, Rodama T, Ogata T. Flow cytometric DNA analysis of parathyroid tumors with special reference to its diagnostic and prognostic value in parathyroid carcinoma. *Cancer* 1990; 65: 1789,.